

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191074** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.07.09

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.10.18

(54) **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЭКСПРЕССИИ ФАКТОРА IX**

(31) 62/747,509; 62/829,009; 62/829,621;
62/840,352

(72) Изобретатель:
Финн Джонатан Дуглас, Хуан Хон-Рен, Рой Монтри, Лай КехДих, Саттлер Рэйчел, Киратсоус Кристос, Ван Чэн (US)

(32) 2018.10.18; 2019.04.03; 2019.04.04;
2019.04.29

(33) US

(86) PCT/US2019/057090

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(87) WO 2020/082046 2020.04.23

(88) 2020.08.13

(71) Заявитель:
**ИНТЕЛЛИА ТЕРАПЬЮТИКС,
ИНК.; РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(57) Предложены композиции и способы экспрессии фактора IX в клетке-хозяине или в популяции клеток-хозяев. Также предложены сконструированные клетки-хозяева, экспрессирующие фактор IX.

A1

202191074

202191074

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-568576EA/050

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЭКСПРЕССИИ ФАКТОРА IX

Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке США № 62/747509, поданной 18 октября 2018 г., предварительной заявке США № 62/829009, поданной 3 апреля 2019 г., предварительной заявке США № 62/829621, поданной 4 апреля 2019 г., и предварительной заявке США № 62/840352, поданной 29 апреля 2019 г. Описание каждой из вышеуказанных заявок в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

Нарушения гемостаза вызваны недостаточной свертываемостью крови. Этот дефицит может быть вызван врожденными нарушениями свертывания крови, приобретенными нарушениями свертывания крови или геморрагическими состояниями, индуцированными травмой. Кровотечение является одним из самых серьезных и существенных проявлений заболевания, оно может происходить локально или быть генерализованным. Локализованное кровотечение может быть связано с поражениями и может дополнительно осложняться нарушением гемостатического механизма. Врожденный или приобретенный дефицит любого из факторов свертывания крови может быть связан со склонностью к кровотечениям. Классические примеры нарушений гемостаза включают гемофилию, такую как гемофилия А, которая возникает в результате дефицита фактора VIII, или гемофилия В (болезнь Кристмаса), которая возникает в результате дефицита фактора IX. Гемофилия встречается во всех расовых и этнических группах и ею поражены многие люди в Соединенных Штатах и во всем мире.

Традиционная терапия нарушений гемостаза включает парентеральное восполнение дефицитных факторов свертывания крови, таких как фактор VII, фактор VIII или фактор IX. Например, в основе современных вариантов лечения гемофилии В лежат постоянные, повторные внутривенные инфузии очищенного рекомбинантного фактора IX. Однако эти варианты лечения имеют ряд недостатков, включая необходимость в повторных внутривенных инфузиях, что было связано с образованием ингибиторов и, в общем случае являются скорее профилактическими, чем лечебными. Смотрите, например, Petrini 2001, Hemophilia 7:99; Fischer et al. 2002, Blood 99 (7):2337.

Генная терапия, которая включает введение пациенту копии отсутствующего или дефектного гена, представляет собой один из возможных методов введения фактора IX пациентам на более длительный срок. Однако существует потребность в дополнительных композициях и способах, которые предлагают улучшенную долгосрочную экспрессию фактора IX.

В настоящем изобретении представлены композиции и способы, применимые для экспрессии фактора IX в клетке-хозяине или популяции клеток-хозяев (*in vitro* или *in vivo*) и для лечения гемофилии (например, гемофилии В). В данном документе предложены гидовые РНК для применения при направленной вставке последовательности, кодирующей фактор IX, в геномный локус человека, например, в безопасный приемный

сайт, такой как безопасный приемный сайт альбумина. Также предложены донорные конструкции (например, двунаправленные конструкции), содержащие последовательность, кодирующую фактор IX, для применения при нацеленной вставке в безопасный приемный сайт, такой как интрон 1 безопасного приемного сайта альбумина. В некоторых вариантах осуществления описанную в данном документе гидовую РНК можно использовать в комбинации с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом (например, Cas-нуклеазой) и донорной конструкцией (например, двунаправленной конструкцией), содержащей трансген фактора IX. В некоторых вариантах осуществления донорную конструкцию (например, двунаправленная конструкция) можно использовать с системой редактирования генов (например, системой CRISPR/Cas; системой на основе цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN); системой на основе эффекторной нуклеазы, подобной активатору транскрипции (TALEN)). В некоторых вариантах осуществления описанную в данном документе гидовую РНК можно использовать в комбинации с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом (например, Cas-нуклеазой) и донорной конструкцией (например, двунаправленной конструкцией), которая содержит трансген фактора IX. Предложены следующие варианты осуществления.

В некоторых аспектах в данном документе предложен способ внесения нуклеиновой кислоты фактора IX в клетку или популяцию клеток, включающий введение: i) конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую белок фактора IX; ii) РНК-направляемого ДНК-связывающего агента; и iii) гидовой РНК (гРНК), содержащей некоторую последовательность. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит последовательность, которая составляет по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит последовательность, которая представляет собой последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 и 97. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит последовательность, которая представляет собой последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит последовательность, которая составляет по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-97. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 98-119. В

некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит последовательность, которая составляет по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 98-119. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит последовательность, которая представляет собой последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 120-163.

В некоторых аспектах в данном документе предложен способ экспрессии фактора IX в клетке или популяции клеток, включающий введение: i) конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую белок фактора IX; ii) РНК-направляемого ДНК-связывающего агента; и iii) гидовой РНК (гРНК), содержащей некоторую последовательность. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит последовательность, которая составляет по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 и 97. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит последовательность, которая составляет по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-97. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 98-119. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит последовательность, которая составляет по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 98-119. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 120-163.

В некоторых аспектах в данном документе предложен способ внесения или экспрессии фактора IX в клетке или популяции клеток, включающий введение: i) конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую белок фактора IX; ii) РНК-направляемого ДНК-связывающего агента; и iii) гидовой РНК (гРНК), содержащей некоторую последовательность, причем введение происходит *in vitro*.

В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29,

31, 32, 33. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 и 97. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-97.

В некоторых вариантах осуществления конструкцию нуклеиновой кислоты вводят в векторе нуклеиновой кислоты и/или липидной наночастице. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент и/или гРНК вводят в векторе нуклеиновой кислоты и/или липидной наночастице. В некоторых вариантах осуществления вектор нуклеиновой кислоты представляет собой вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор выбран из группы, состоящей из аденоассоциированного вирусного вектора (AAV), аденовирусного вектора, ретровирусного вектора и лентивирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления AAV-вектор выбран из группы, состоящей из AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV8, AAV-DJ и AAV2/8.

В некоторых вариантах осуществления конструкцию нуклеиновой кислоты, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент и гРНК вводят последовательно, в любом порядке и/или в любой комбинации. В некоторых вариантах осуществления конструкцию нуклеиновой кислоты, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент и гРНК, отдельно или в любой комбинации, вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или РНК-направляемый ДНК-связывающий агент и гРНК в комбинации вводят до введения конструкции нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления конструкцию нуклеиновой кислоты вводят до введения гРНК и/или РНК-направляемого ДНК-связывающего агента.

В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas-нуклеазу. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой Cas-нуклеазу 2 класса. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой Cas9. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой Cas9-нуклеазу *S. pyogenes*. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой никазу.

В некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты представляет собой двунаправленную конструкцию нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты является одноцепочечной

или двухцепочечной. В некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты представляет собой одноцепочечную ДНК или двухцепочечную ДНК. В некоторых вариантах осуществления двунаправленная конструкция не содержит промотор, который управляет экспрессией белка фактора IX. В некоторых вариантах осуществления клетка или популяция клеток экспрессируют фактор IX с гетерологичным пептидом, таким как сигнальный пептид альбумина.

В некоторых вариантах осуществления клетка или популяция клеток включают клетку печени. В некоторых вариантах осуществления клетка печени представляет собой гепатоцит.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует белок фактора IX дикого типа. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует мутантный белок фактора IX. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует белок фактора IX, имеющий мутацию R338L.

В некоторых аспектах в данном документе предложен способ внесения нуклеиновой кислоты фактора IX в клетку или популяцию клеток, включающий введение в клетку или популяцию клеток двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую белок фактора IX, обеспечивая тем самым экспрессию фактора IX в клетке или популяции клеток. В данном документе предложен способ экспрессии фактора IX в клетке или популяции клеток, включающий введение в клетку или популяцию клеток двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую белок фактора IX, обеспечивая тем самым экспрессию фактора IX в клетке или популяции клеток.

В некоторых вариантах осуществления двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты содержит: а) первый сегмент, содержащий кодирующую последовательность для фактора IX; и б) второй сегмент, содержащий обратную комплементарную последовательность кодирующей последовательности фактора IX, причем конструкция не содержит промотор, который управляет экспрессией фактора IX. В некоторых вариантах осуществления двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты содержит: а) первый сегмент, содержащий кодирующую последовательность для фактора IX; и б) второй сегмент, содержащий обратную комплементарную последовательность кодирующей последовательности второго полипептида, причем конструкция не содержит промотор, который управляет экспрессией полипептида.

В некоторых вариантах осуществления способ внесения нуклеиновой кислоты фактора IX в клетку или популяцию клеток дополнительно включает введение РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение гРНК. В некоторых вариантах осуществления двунаправленную конструкцию нуклеиновой кислоты вводят в векторе нуклеиновой кислоты и/или липидной наночастице. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент вводят в векторе нуклеиновой кислоты и/или липидной наночастице. В некоторых вариантах осуществления гРНК вводят в векторе

нуклеиновой кислоты и/или липидной наночастице. В некоторых вариантах осуществления вектор нуклеиновой кислоты представляет собой вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор выбран из группы, состоящей из аденоассоциированного вирусного вектора (AAV), аденовирусного вектора, ретровирусного вектора и лентивирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления AAV-вектор выбран из группы, состоящей из AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV8, AAV-DJ и AAV2/8.

В некоторых вариантах осуществления двунаправленную конструкцию нуклеиновой кислоты, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент и гРНК вводят последовательно, в любом порядке и/или в любой комбинации. В некоторых вариантах осуществления двунаправленную конструкцию нуклеиновой кислоты, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент и гРНК в любой комбинации вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или РНК-направляемый ДНК-связывающий агент и гРНК в комбинации вводят до введения двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления двунаправленную конструкцию нуклеиновой кислоты вводят до введения гРНК и/или РНК-направляемого ДНК-связывающего агента.

В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas-нуклеазу. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой Cas-нуклеазу 2 класса. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза выбрана из группы, состоящей из нуклеазы *S. pyogenes*, нуклеазы *S. aureus*, нуклеазы *C. jejuni*, нуклеазы *S. thermophilus*, нуклеазы *N. meningitidis* и их вариантов. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой Cas9. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой Cas10.

В некоторых вариантах осуществления двунаправленная конструкция не содержит промотор, который управляет экспрессией белка фактора IX. В некоторых вариантах осуществления двунаправленная конструкция является одноцепочечной или двухцепочечной. В некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты представляет собой одноцепочечную ДНК или двухцепочечную ДНК. В некоторых вариантах осуществления гРНК содержит по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33, или последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33.

В некоторых аспектах в данном документе предложена композиция для применения при экспрессии фактора IX в клетке, причем композиция содержит: i) конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность, кодирующую белок фактора IX; ii) РНК-направляемый ДНК-связывающий агент; и iii) гидовую РНК (гРНК), содержащую направляющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33, или последовательность, которая по меньшей мере на

95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В данном документе предложена композиция для применения при экспрессии фактора IX в клетке или популяции клеток, причем композиция содержит двунаправленную конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность, кодирующую белок фактора IX. В некоторых вариантах осуществления клетку-хозяин получают способом по любому из предыдущих вариантов осуществления.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку печени. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин принадлежит типу непролиферирующих клеток. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин экспрессирует полипептид фактора IX, кодируемый двунаправленной конструкцией. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой гепатоцит.

В некоторых вариантах осуществления способа, конструкции или клетки-хозяина любого из указанных выше способов гРНК содержит SEQ ID NO: 401.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 проиллюстрированы форматы конструкций, представленных в геномах AAV. AC=акцептор сплайсинга; pA=сигнальная последовательность поли-А; ПГ=плечо гомологии; ЛПГ=левое плечо гомологии; ППГ=правое плечо гомологии

На Фиг. 2 проиллюстрировано, что векторы без плеч гомологии неэффективны в иммортализованной линии клеток печени (Hepal-6). scAAV, полученный из плазмиды P00204, содержащей 200 п. о. плечи гомологии, приводил к экспрессии hFIX в делящихся клетках. Использование AAV-векторов, полученных из P00123 (scAAV с отсутствием плеч гомологии) и P00147 (двунаправленная конструкция ssAAV с отсутствием плеч гомологии), не приводило к обнаруживаемой экспрессии hFIX.

На Фиг. 3А и 3В проиллюстрированы результаты *in vivo* исследования вставочных матриц с плечами гомологии и без них с использованием векторов, полученных из P00123, P00147 или P00204. На Фиг. 3А проиллюстрировано, что в каждой группе животных, обработанных ЛНЧ, содержащими компоненты CRISPR/Cas9, были обнаружены уровни редактирования в печени, составляющие ~ 60% по данным измерений инделей. На Фиг. 3В проиллюстрировано, что животные, получавшие ssAAV-векторы без плеч гомологии (полученные из P00147) в комбинации с обработкой ЛНЧ, имели наибольший уровень экспрессии hFIX в сыворотке.

На Фиг. 4А и 4В проиллюстрированы результаты *in vivo* исследования вставочных матриц ssAAV с плечами гомологии и без них. На Фиг. 4А проиллюстрировано сравнение направленной вставки с помощью векторов, полученных из плазмид P00350, P00356, P00362 (имеющих, как проиллюстрировано, асимметричные плечи гомологии) и P00147 (двунаправленной конструкции, проиллюстрированной на Фиг. 4В). На Фиг. 4В проиллюстрировано сравнение вставки во второй сайт, на который были нацелены векторы, полученные из плазмид P00353, P00354 (имеющие, как проиллюстрировано, симметричные плечи гомологии) и P00147.

На Фиг. 5A-5D проиллюстрированы результаты направленной вставки двунаправленных конструкций среди 20 целевых сайтов в первичных гепатоцитах мышей. На Фиг. 5A приведены схематические изображения каждого из исследуемых векторов. На Фиг. 5B проиллюстрировано редактирование по данным измерения образования инделей для каждой из групп обработки для каждой исследуемой комбинации. На Фиг. 5C и Фиг. 5D проиллюстрировано, что значительные уровни редактирования (т. е. образование инделей в конкретном целевом сайте) не обязательно приводят к более эффективной вставке или экспрессии трансгена. чАС=акцептор сплайсинга F9 человека; мАС=акцептор сплайсинга альбумина мыши; HiBit=tag для обнаружения на основе люциферазы; пА=сигнальная последовательность поли-А; Nluc=репортер нанолуциферазы; ЗФБ=зеленый флуоресцентный белок.

На Фиг. 6 проиллюстрированы результаты *in vivo* скрининга направленной вставки с помощью двунаправленных конструкций среди 10 целевых сайтов с использованием ssAAV, полученного из P00147. Как проиллюстрировано, значительные уровни образования инделей не обязательно приводят к высоким уровням экспрессии трансгена.

На Фиг. 7A-7D проиллюстрированы результаты *in vivo* скрининга двунаправленных конструкций среди 20 целевых сайтов с использованием ssAAV, полученного из P00147. На Фиг. 7A проиллюстрировано, что для каждой из групп обработки для каждой исследуемой комбинации ЛНЧ/вектор были обнаружены различные уровни редактирования по данным измерения образования инделей. На Фиг. 7B приведены соответствующие данные по направленной вставке. Результаты демонстрируют слабую корреляцию между образованием инделей и вставкой или экспрессией двунаправленных конструкций (Фиг. 7B и Фиг. 7D), а также положительную корреляцию между результатами *in vitro* и *in vivo* (Фиг. 7C).

На Фиг. 8A и 8B проиллюстрирована введение двунаправленной конструкции на клеточном уровне методом гибридизации *in situ* с использованием зондов, которые могут обнаруживать соединения между трансгеном hFIX и последовательностью экзона 1 мышинового альбумина (Фиг. 8A). Уровни циркулирующего hFIX коррелировали с числом клеток, положительных в отношении гибридного транскрипта (Фиг. 8B).

На Фиг.9 проиллюстрировано влияние изменения времени между доставкой ssAAV, содержащего двунаправленную конструкцию hFIX, и ЛНЧ на направленную вставку.

На Фиг.10 проиллюстрировано влияние на направленную вставку изменения числа доз ЛНЧ (например, 1, 2 или 3) после доставки двунаправленной конструкции hFIX.

На Фиг.11A проиллюстрирована продолжительность экспрессии hFIX *in vivo*. На Фиг. 11B продемонстрировано, что экспрессия интрона 1 альбумина была устойчивой.

На Фиг. 12A и 12B проиллюстрировано, что изменение дозы AAV или ЛНЧ может модулировать степень экспрессии hFIX из интрона 1 гена альбумина *in vivo*.

На Фиг. 13A-13C проиллюстрированы результаты скрининга двунаправленных конструкций среди целевых сайтов в первичных гепатоцитах яванских макаков. На Фиг.

13А проиллюстрированы различные уровни редактирования для каждого из образцов по данным измерения образования инделей. Фиг. 13В и Фиг. 13С проиллюстрировано, что значительные уровни образования инделей не были прогностическими в отношении вставки или экспрессии двунаправленных конструкций в интрон 1 альбумина.

На Фиг. 14А-14С проиллюстрированы результаты скрининга двунаправленных конструкций среди целевых сайтов в первичных гепатоцитах человека. На Фиг. 14А проиллюстрировано редактирование для каждого из образцов по данным измерения образования инделей. Фиг. 14В, Фиг. 14С и 14D проиллюстрировано, что значительные уровни образования инделей не были прогностическими в отношении вставки или экспрессии двунаправленных конструкций в интрон 1 гена альбумина.

На Фиг. 15 проиллюстрированы результаты *in vivo* исследований, в которых отличным от человека приматам вводили дозу ЛНЧ вместе с двунаправленной вставочной матрицей hFIX (полученной из P00147). Системные уровни hFIX были достигнуты только у животных, обработанных как ЛНЧ, так и AAV, причем при применении AAV или ЛНЧ по отдельности hFIX не подлежал обнаружению.

На Фиг.16А и 16В проиллюстрированы уровни экспрессии человеческого фактора IX в образцах плазмы на 6 неделе после инъекции.

На Фиг. 17 проиллюстрированы сывороточные уровни на 7 неделе и % положительных клеток среди множественных долей для каждого животного.

На Фиг.18 проиллюстрированы уровни экспрессии человеческого фактора IX в образцах плазмы в каждой группе через 1, 2 и 4 недели после инъекции.

На Фиг.19 проиллюстрировано введение трансгена hF9 и функция свертывания в анализе АЧТВ.

На Фиг.20А и 20В проиллюстрирована вставка трансгена hF9 и образование тромбина в анализе TGA-ЕА.

На Фиг. 21 проиллюстрирована вставка трансгена hF9 и образование тромбина.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Далее будет приведено подробное описание определенных вариантов осуществления изобретения, примеры которых проиллюстрированы на прилагаемых графических материалах. Хотя изобретение описано в сочетании с проиллюстрированными вариантами осуществления, следует понимать, что это не подразумевает ограничения изобретения данными вариантами осуществления. Наоборот, подразумевается, что изобретение охватывает все альтернативные варианты, модификации и эквиваленты, которые могут быть включены в объем изобретения, определяемый прилагаемой формулой изобретения.

Перед подробным описанием представленных идей следует понимать, что изобретение не ограничено конкретными композициями или этапами процессов, поскольку они могут варьироваться. Следует отметить, что, в контексте данного описания и прилагаемых вариантов осуществления форма единственного числа включает отсылку на множественное число, если из контекста четко не следует иное. Таким образом,

например, ссылка на «конъюгат» включает множество конъюгатов, а ссылка на «клетку» включает множество или популяцию клеток и т. п. В контексте данного документа термин «включать» и его грамматические варианты не подразумевают ограничения, поэтому перечисление элементов в списке не исключает другие подобные элементы, которыми можно заменять или которые можно добавлять к перечисленным элементам.

Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Подразумевается, что измеренные и измеряемые значения являются приблизительными с учетом значимых знаков и погрешности, связанной с измерением. Также использование терминов «содержать», «содержит», «содержащий», «включать», «включает» и «включающий» не подразумевает ограничения. Следует понимать, что вышеприведенное общее описание и нижеприведенное подробное описание являются лишь иллюстративными и пояснительными и не ограничивают идеи изобретения.

Если специально не указано в описании, варианты осуществления в описании, которые указаны как «содержащие» различные компоненты, также рассматриваются как «состоящие из» или «состоящие преимущественно из» перечисленных компонентов; варианты осуществления в описании, которые указаны как «состоящие из» различных компонентов, также рассматриваются как «содержащие» или «состоящие преимущественно из» перечисленных компонентов; и варианты осуществления в описании, которые указаны как «состоящие преимущественно из» различных компонентов, также рассматриваются как «состоящие из» или «содержащие» перечисленные компоненты (эта взаимозаменяемость не применима к использованию этих терминов в формуле изобретения). Термин «или» используется во включительном смысле, т. е. он эквивалентен «и/или», если из контекста четко не следует иное. Термин «около», используемый перед перечнем, модифицирует каждый элемент перечня. Термин «около» или «приблизительно» означает допустимую ошибку для конкретного значения, определяемую специалистом в данной области техники, которая частично зависит от того, как данное значение измеряют или определяют.

Термин «около», используемый перед перечнем, модифицирует каждый элемент перечня. Термин «около» или «приблизительно» означает допустимую ошибку для конкретного значения, определяемую специалистом в данной области техники, которая частично зависит от того, как данное значение измеряют или определяют.

Заголовки разделов, используемые в данном документе, приведены исключительно в организационных целях, и их не следует толковать как ограничивающие каким-либо образом предмет изобретения. В случае, если какой-либо материал, включенный посредством ссылки, противоречит любому термину, определенному в этом описании, или любому другому явному содержанию этого описания, приоритет имеет это описание.

Определения

Если не указано иное, в контексте данного документа следующие термины и выражения имеют следующие значения:

В контексте данного документа «полинуклеотид» и «нуклеиновая кислота»

обозначают мультимерное соединение, содержащее нуклеозиды или аналоги нуклеозидов, которые состоят из азотистых гетероциклических оснований или аналогов оснований, связанных вместе вдоль остова, включая традиционные РНК, ДНК, смешанные РНК-ДНК и полимеры, которые являются их аналогами. «Остов» нуклеиновой кислоты может состоять из ряда связей, включая одну или более сахарно-фосфодиэфирных связей, связей пептид - нуклеиновая кислота («пептидные нуклеиновые кислоты» или ПНК; РСТ № WO 95/32305), тиофосфатных связей, метилфосфонатных связей или их комбинаций. Сахарные фрагменты нуклеиновой кислоты могут представлять собой рибозу, дезоксирибозу или аналогичные соединения с заменами, например, 2'-метокси- или 2'-галогенидными заменами. Азотистые основания могут представлять собой традиционные основания (A, G, C, T, U), их аналоги (например, модифицированные уридины, такие как 5-метоксиуридин, псевдоуридин или N1-метилпсевдоуридин или другие); инозин; производные пуринов или пиримидинов (например, N⁴-метилдезоксигуанозин, деаза- или азапурины, деаза- или азапиримидины, пиримидиновые основания с группами заместителей в позиции 5 или 6 (например, 5-метилцитозин), пуриновые основания с заместителем в позициях 2, 6 или 8, 2-амино-6-метиламинопурин, O⁶-метилгуанин, 4-тиопиримидины, 4-аминопиримидины, 4-диметилгидразинпиримидины и O⁴-алкилпиримидины; патент США № 5378825 и РСТ № WO 93/13121). Общее обсуждение смотрите в *The Biochemistry of the Nucleic Acids* 5-36, Adams et al., ed., 11th ed., 1992). Нуклеиновые кислоты могут содержать один или более «абазических» остатков, остов которых не содержит азотистых оснований для позиции(й) полимера (патент США № 5585481). Нуклеиновая кислота может содержать только традиционные сахара, основания и связи РНК или ДНК или может включать как традиционные компоненты, так и замены (например, традиционные основания с 2'-метокси-связями или полимеры, содержащие как традиционные основания, так и один или более аналогов оснований). Нуклеиновая кислота включает «закрытую нуклеиновую кислоту» (ЗНК), аналог, содержащий один или более нуклеотидных мономеров ЗНК с бициклическим фуранозным звеном, замкнутым в имитирующую РНК сахарную конформацию, что повышает аффинность гибридизации к комплементарным последовательностям РНК и ДНК (Vester and Wengel, 2004, *Biochemistry* 43(42):13233-41). РНК и ДНК имеют разные сахарные фрагменты и могут отличаться наличием урацила или его аналогов в РНК и тимина или его аналогов в ДНК.

Термины «гидовая (направляющая) РНК», «гРНК» и просто «направляющая» взаимозаменяемо используют в данном документе для обозначения направляющей, которая содержит направляющую последовательность, например, crРНК (также известную как CRISPR РНК), или комбинацию crРНК и trРНК (также известной как tracrРНК). crРНК и trРНК могут быть связаны в виде одной молекулы РНК (одинарная гидовая РНК, ogРНК) или, например, в виде двух отдельных молекул РНК (двойная гидовая РНК, dgРНК). Термин «гидовая РНК» или «гРНК» относится к каждому типу. trРНК может представлять собой последовательность природного происхождения или последовательность trРНК с модификациями или вариациями по сравнению с

последовательностями природного происхождения. Гидовые РНК, такие как оgРНК или дgРНК, могут включать модифицированные РНК, как описано в данном документе.

В контексте данного документа «направляющая последовательность» относится к последовательности в гидовой РНК, которая является комплементарной целевой последовательности, а ее функция состоит в направлении гидовой РНК к целевой последовательности для связывания или модификации (например, расщепления) РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом. «Направляющая последовательность» также может называться «нацеливающей последовательностью» или «спейсерной последовательностью». Направляющая последовательность может иметь длину в 20 пар оснований, например, в случае *Streptococcus pyogenes* (т. е. *Spy Cas9*) и родственных гомологов/ортологов *Cas9*. Также в качестве направляющих можно использовать более короткие или более длинные последовательности, например, длиной 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов. Например, в некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность находится, например, в гене или хромосоме и является комплементарной направляющей последовательности. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности или идентичности между направляющей последовательностью и соответствующей ей целевой последовательностью может составлять около 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%. Например, в некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность содержит последовательность с 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью с по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежными нуклеотидами последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность и целевая область могут быть на 100% комплементарными или идентичными. В других вариантах осуществления направляющая последовательность и целевая область могут содержать по меньшей мере одно несовпадение. Например, направляющая последовательность и целевая последовательность могут содержать 1, 2, 3 или 4 несовпадения, при этом общая длина целевой последовательности составляет по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более пар оснований. В некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность и целевая последовательность могут содержать 1-4 несовпадения, при этом направляющая последовательность содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность и целевая область могут содержать 1, 2, 3 или 4 несовпадения, при этом направляющая последовательность содержит 20 нуклеотидов.

Целевые последовательности для РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов включают как положительные, так и отрицательные цепи геномной ДНК (т. е. заданную последовательность и обратную комплементарную последовательность), поскольку субстратом нуклеиновой кислоты для РНК-направляемого ДНК-связывающего агента

является двухцепочечная нуклеиновая кислота. Соответственно, когда говорят, что направляющая последовательность «является комплементарной целевой последовательности», следует понимать, что направляющая последовательность может направлять гидовую РНК для связывания с обратной комплементарной последовательностью целевой последовательности. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, в которых направляющая последовательность связывает обратную комплементарную последовательность целевой последовательности, направляющая последовательность идентична определенным нуклеотидам целевой последовательности (например, целевой последовательности, не содержащей РАМ), за исключением замены U на T в гидовой последовательности.

В контексте данного документа «РНК-направляемый ДНК-связывающий агент» означает полипептид или комплекс полипептидов, обладающих активностью связывания РНК и ДНК, или ДНК-связывающую субъединицу такого комплекса, причем ДНК-связывающая активность является специфической для последовательности и зависит от последовательности РНК. Термин «РНК-направляемый ДНК-связывающий агент» также включает нуклеиновые кислоты, кодирующие такие полипептиды. Типовые РНК-направляемые ДНК-связывающие агенты включают кливазы/никазы Cas. Типовые РНК-направляемые ДНК-связывающие агенты могут включать инактивированные формы («ДНК-связывающие агенты dCas»), например, если эти агенты модифицированы с возможностью расщепления ДНК, например, посредством слияния с доменом расщепления FokI. В контексте данного документа термин «Cas-нуклеаза» включает Cas-кливазы и Cas-никазы. Cas-кливазы и Cas-никазы включают комплекс Csm или Cmr системы CRISPR типа III, его субъединицу Cas10, Csm1 или Cmr2, комплекс Cascade системы CRISPR типа I, ее субъединицу Cas3 и Cas-нуклеазы 2 класса. В контексте данного документа «Cas-нуклеаза 2 класса» представляет собой одноцепочечный полипептид с РНК-направляемой ДНК-связывающей активностью. Cas-нуклеазы 2 класса включают кливазы/никазы Cas 2 класса (например, варианты H840A, D10A или N863A), которые дополнительно обладают активностью РНК-направляемых кливаз или никаз ДНК и ДНК-связывающих агентов dCas класса 2, в которых активность кливазы/никазы инактивирована), если эти агенты модифицированы с возможностью расщепления ДНК. Cas-нуклеазы 2 класса включают, например, белки Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2, C2c3, HF Cas9 (например, варианты N497A, R661A, Q695A, Q926A), НураCas9 (например, варианты N692A, M694A, Q695A, H698A), eSPCas9(1,0) (например, варианты K810A, K1003A, R1060A) и eSPCas9(1,1) (например, например K848A, K1003A, R1060A) и их модификации. Белок Cpf1, Zetsche et al., Cell, 163: 1-13 (2015), также содержит RuvC-подобный домен нуклеазы. Последовательности Cpf1 Zetsche в полном объеме включены посредством ссылки. Смотрите, например, Zetsche, таблицы S1 и S3. Смотрите, например, Makarova et al., Nat Rev Microbiol, 13(11): 722-36 (2015); Shmakov et al., Molecular Cell, 60:385-397 (2015). В контексте данного документа доставка РНК-направляемого ДНК-связывающего агента (например, Cas-нуклеазы, Cas9-нуклеазы или Cas9-нуклеазы S.

ryogenes) включает доставку полипептида или мРНК.

В контексте данного документа термин «рибонуклеопротеин» (РНП) или «комплекс РНП» относится к гидовой РНК вместе с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом, таким как Cas-нуклеаза, например, Cas-кливаза, Cas-никаза или ДНК-связывающий агент dCas (например, Cas9). В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas9, к целевой последовательности, агент связывается с целевой последовательностью, а гидовая РНК гибридизуется с ней; в случаях, когда агент представляет собой кливазу или никазу, за связыванием может следовать расщепление или создание одноцепочечного разрыва.

В контексте данного документа считается, что первая последовательность «содержит последовательность с по меньшей мере X % идентичности со» второй последовательностью, если выравнивание первой последовательности относительно второй последовательностью показывает, что X % или более позиций второй последовательности совпадают с первой последовательностью. Например, последовательность AAGA содержит последовательность со 100% идентичности с последовательностью AAG, поскольку выравнивание даст 100% идентичности в том смысле, что присутствуют совпадения со всеми тремя позициями второй последовательности. Различия между РНК и ДНК (в общем случае замена уридина на тимидин или наоборот) и наличие аналогов нуклеозидов, таких как модифицированные уридины, не влияют на различия в идентичности или комплементарности среди полинуклеотидов при условии, что соответствующие нуклеотиды (такие как тимидин, уридин или модифицированный уридин) имеют один и тот же комплемент (например, аденозин для всех из тимидина, уридина или модифицированного уридина; другим примером является цитозин и 5-метилцитозин, которые оба содержат гуанозин или модифицированный гуанозин в качестве комплемента). Таким образом, например, последовательность 5'-AXG, где X представляет собой любой модифицированный уридин, такой как псевдоуридин, N1-метил-псевдоуридин или 5-метоксиуридин, считается на 100% идентичной AUG в том смысле, что они обе полностью комплементарны одной и той же последовательности (5'-CAU). Типовыми алгоритмами выравнивания являются алгоритмы Смита - Уотермана и Нидлмана - Вунша, которые хорошо известны в данной области техники. Специалист в данной области поймет, какой выбор алгоритма и настроек параметров подходит для заданной пары последовательностей, подлежащих выравниванию; в случае последовательностей в целом одинаковой длины и с ожидаемой идентичностью > 50% для аминокислот или > 75% для нуклеотидов в общем случае подходит алгоритм Нидлмана - Вунша с настройками интерфейса алгоритма Нидлмана - Вунша по умолчанию, предоставленный EBI на веб-сервере www.ebi.ac.uk.

В контексте данного документа первая последовательность считается «на X % комплементарной» второй последовательности, если X % оснований первой последовательности спариваются со второй последовательностью. Например, первая

последовательность 5'ААГА3' является на 100% комплементарной второй последовательности 3'ТТСТ5', а вторая последовательность является на 100% комплементарной первой последовательности. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность 5'ААГА3' является на 100% комплементарной второй последовательности 3'ТТСТГТГА5', тогда как вторая последовательность является на 50% комплементарной первой последовательности.

В контексте данного документа термин «мРНК» относится к полинуклеотиду, который полностью или преимущественно представляет собой РНК или модифицированную РНК и содержит открытую рамку считывания, которая может транслироваться в полипептид (т. е. может служить субстратом для трансляции рибосомой и аминокислотами тРНК). мРНК может содержать фосфатно-сахарный остов, включая остатки рибозы или их аналоги, например, остатки 2'-метоксирибозы. В некоторых вариантах осуществления сахара фосфатно-сахарного остова мРНК состоят преимущественно из остатков рибозы, остатков 2'-метоксирибозы или их комбинации.

Направляющие последовательности, применимые в описанных в данном документе композициях гидовых РНК и способах, приведены в таблице 1 по всему объему заявки.

В контексте данного документа «индели» относятся к инсерционным/делеционным мутациям, состоящим из ряда нуклеотидов, которые вставлены или удалены в сайте двухцепочечных разрывов (ДЦР) в целевой нуклеиновой кислоте.

В контексте данного документа термин «фактор IX» используют взаимозаменяемо с «FIX» или «F9», и он также известен как фактор Кристмаса. Последовательность белка человеческого фактора IX дикого типа доступна на NCBI NP_000124; последовательность гена доступна на NCBI NM_000133. Примеры белковой последовательности фактора IX описаны в данном документе (например, SEQ ID NO: 700, SEQ ID NO: 701 и/или SEQ ID NO: 702). В контексте данного документа фактор IX также включает вариант фактора IX, например, вариант, который обладает повышенной коагуляционной активностью по сравнению с фактором IX дикого типа. Гиперактивный вариант фактора IX может содержать замену R338. Пример такого варианта фактора IX содержит мутацию R338L по сравнению с SEQ ID NO: 701. Термины гиперактивный и гиперфункциональный взаимозаменяемо используют в данном документе. Дополнительные примеры варианта фактора IX содержат аминокислоту в остатке 338, выбранную из аланина, лейцина, валина, изолейцина, фенилаланина, триптофана, метионина, серина и треонина. Дополнительные варианты фактора IX содержат аминокислоту в остатке 338, выбранную из лейцина, цистеина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, гистидина, лизина, аспарагина, глутамина или тирозина. В контексте данного документа фактор IX также включает вариант, который является на 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 99% идентичным SEQ ID NO: 700 и имеет по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, 100% или более активности по сравнению с фактором IX дикого типа. В контексте данного документа фактор IX также включает вариант, который является на 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 99% идентичным SEQ ID NO: 700 и имеет по меньшей

мере 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, 100% или более активности по сравнению с SEQ ID NO: 701 или SEQ ID NO: 702. В контексте данного документа фактор IX также включает фрагмент, который обладает по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, 100% или более активности по сравнению с фактором IX дикого типа. В некоторых вариантах осуществления вариант фактора IX может представлять собой гиперактивный вариант фактора IX. В определенных случаях вариант фактора IX обладает от около 80% до около 100%, 120%, 140%, 160%, 180% или 200% активности по сравнению с фактором IX дикого типа. Специфическую активность варианта фактора IX можно использовать для расчета его функционально нормализованной активности, например, как описано в примере 13. Специфическая активность вариантов фактора IX, например R338L, известна в литературе и может быть рассчитана известными методами. Гиперфункциональный вариант фактора IX может иметь специфическую активность в около 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12 или 15 раз больше, чем у соответствующего белка фактора IX дикого типа. В одном варианте осуществления гиперфункциональный фактор IX может иметь специфическую активность в около 8-12 раз больше, чем соответствующий белок фактора IX дикого типа. В другом варианте осуществления гиперфункциональный фактор IX может иметь специфическую активность в около 1,2-5 раз больше, чем соответствующий белок фактора IX дикого типа. Типовые последовательности известны в данной области техники и включают, например, последовательности, приведенные в патентах США №№ 4770999, 4994371, 5521070, 6046380, 6531298 и 8383388.

В контексте данного документа «целевая последовательность» относится к последовательности нуклеиновой кислоты в целевом гене, которая комплементарна направляющей последовательности гРНК. Взаимодействие целевой последовательности и направляющей последовательности заставляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент связываться и потенциально создавать одноцепочечный разрыв или расщепление (в зависимости от активности агента) внутри целевой последовательности.

В контексте данного документа термин «гемофилия» относится к нарушению, вызванному отсутствием или дефектом гена или полипептида фактора IX. Нарушение включает патологические состояния, которые являются наследственными и/или приобретенными (например, вызванными спонтанной мутацией в гене), и включает гемофилию В. В некоторых вариантах осуществления дефектный ген или полипептид фактора IX приводит к снижению уровня фактора IX в плазме и/или снижению коагуляционной активности фактора IX. В контексте данного документа гемофилия включает легкую, умеренную и тяжелую гемофилию. Например, людей с менее чем около 1% активного фактора классифицируют как имеющих тяжелую гемофилию, люди с около 1-5% активного фактора имеют умеренную гемофилию, а люди с легкой гемофилией имеют около 5-40% от нормального уровня активного фактора свертывания крови.

В контексте данного документа «нормальные» или «здоровые» индивиды включают тех, кто имеет от 50 до 160% от нормального совокупного плазменного уровня

активности фактора IX и уровней антигена. С учетом очищения из плазмы крови человека, концентрация фактора IX у нормального взрослого человека (нормальный совокупный плазменный уровень фактора IX) составляет около 300-400 мкг/мл плазмы. В некоторых вариантах осуществления уровень фактора IX, например, циркулирующего фактора IX, можно измерить с помощью анализа коагуляции и/или иммунологического анализа, например, сэндвич-иммуноанализа, ELISA (смотрите, например, пример 13), MSD (смотрите, например, пример 14). Прокоагулирующую активность фактора IX определяют по способности плазмы пациента корректировать время свертывания плазмы с дефицитом фактора IX.

В контексте данного документа «лечение» относится к любому введению или применению терапевтического средства для лечения заболевания или нарушения у субъекта и включает ингибирование заболевания, прекращение его развития, облегчение одного или более симптомов заболевания, излечение заболевания или предотвращение повторного появления одного или более симптомов заболевания. Например, лечение гемофилии может включать смягчение симптомов гемофилии.

В контексте данного документа «двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты» (взаимозаменяемо называемая в данном документе «двунаправленной конструкцией») содержит по меньшей мере два сегмента нуклеиновой кислоты, причем один сегмент (первый сегмент) содержит кодирующую последовательность, которая кодирует представляющий интерес полипептид (кодирующая последовательность может называться в данном документе «трансгеном» или первым трансгеном), тогда как другой сегмент (второй сегмент) содержит последовательность, в которой комплементарная последовательность кодирует представляющий интерес полипептид, или второй трансген. Это означает, что по меньшей мере два сегмента могут кодировать идентичные или разные полипептиды. Когда два сегмента кодируют идентичный полипептид, кодирующая последовательность первого сегмента не обязательно должна быть идентична комплементарной последовательности второго сегмента. В некоторых вариантах осуществления последовательность второго сегмента является обратной комплементарной последовательностью кодирующей последовательности первого сегмента. Двунаправленная конструкция может быть одноцепочечной или двухцепочечной. Описанная в данном документе двунаправленная конструкция включает конструкцию, которая способна экспрессировать любой представляющий интерес полипептид.

В некоторых вариантах осуществления двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты содержит первый сегмент, который содержит кодирующую последовательность, кодирующую первый полипептид (первый трансген), и второй сегмент, который содержит последовательность, в которой комплементарная последовательность кодирует второй полипептид (второй трансген). В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды являются по меньшей мере на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичными. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды содержат

аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной, например, в 50, 100, 200, 500, 1000 или более аминокислотных остатках.

В контексте данного документа термин «обратная комплементарная последовательность» относится к последовательности, которая является комплементарной последовательностью референсной последовательности, при этом комплементарная последовательность записана в обратной ориентации. Например, в случае гипотетической последовательности 5'CTGGACCGA3' (SEQ ID NO: 500) «идеальной» комплементарной последовательностью является 3'GACCTGGCT5' (SEQ ID NO: 501), а «идеальная» обратная комплементарная последовательность записывается как 5'TCGGTCCAG3' (SEQ ID NO: 502). Обратная комплементарная последовательность не обязательно должна быть «идеальной» и при этом может кодировать тот же полипептид или сходный полипептид, что и референсная последовательность. Вследствие избыточной частоты использования кодонов обратная комплементарная последовательность может отличаться от референсной последовательности, кодирующей тот же полипептид. В контексте данного документа термин «обратная комплементарная последовательность» также включает последовательности, которые являются, например, на 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичными обратной комплементарной последовательности референсной последовательности.

В контексте данного документа термин «полипептид» относится к белку дикого типа или вариантному белку (например, мутанту, фрагменту, слиянию или их комбинациям). Вариантный полипептид может обладать по меньшей мере или около 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% функциональной активности полипептида дикого типа. В некоторых вариантах осуществления вариант является по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичным последовательности полипептида дикого типа. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид может представлять собой гиперактивный вариант. В определенных случаях вариант обладает от около 80% до около 120%, 140%, 160%, 180%, 200%, 300%, 400%, 500% или более функциональной активности полипептида дикого типа.

В контексте данного документа термин «гетерологичный ген» относится к гену, который был внесен в качестве экзогенного источника в сайт в геноме клетки-хозяина (например, в геномный локус, такой как безопасный приемный локус, включая сайт интрона 1 альбумина). Это означает, что внесенный ген является гетерологичным по отношению к сайту вставки. Полипептид, экспрессируемый из такого гетерологичного гена, называется «гетерологичным полипептидом». Гетерологичный ген может иметь природное происхождение или быть сконструированным, и может быть дикого типа или вариантным. Гетерологичный ген может содержать нуклеотидные последовательности, отличные от последовательности, кодирующей гетерологичный полипептид (например,

сайт внутренней посадки рибосомы). Гетерологичный ген может представлять собой ген, который встречается в природе в геноме хозяина в виде гена дикого типа или варианта (например, мутантного). Например, хотя клетка-хозяин содержит представляющий интерес ген (как ген дикого типа или вариант), тот же ген или его вариант можно вносить в качестве экзогенного источника, например, для экспрессии в локусе с высокой экспрессией. Гетерологичный ген также может представлять собой ген, который не встречается в природе в геноме хозяина, или который экспрессирует гетерологичный полипептид, который в природе не встречается в геноме хозяина. Термины «гетерологичный ген», «экзогенный ген» и «трансген» используют взаимозаменяемо. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный ген или трансген содержит экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, например, последовательность нуклеиновой кислоты не является эндогенной для клетки-реципиента. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный ген или трансген содержит экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, например, последовательность нуклеиновой кислоты, которая в природе не встречается в клетке-реципиенте. Например, гетерологичный ген может быть гетерологичным в отношении сайта его вставки и в отношении клетки-реципиента.

«Безопасный приемный» локус представляет собой локус в геноме, в который ген может быть вставлен без существенного вредного воздействия на клетку-хозяина, например, гепатоцит, например, не обуславливая апоптоз, некроз и/или старение, или не обуславливая более 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% или 40% апоптоза, некроза и/или старения, по сравнению с контрольной клеткой. Смотрите, например, Hsin et al., “Hepatocyte death in liver inflammation, fibrosis, and tumorigenesis,” 2017.. В некоторых вариантах осуществления безопасный приемный локус обеспечивает сверхэкспрессию экзогенного гена без существенного вредного воздействия на клетку-хозяина, например, гепатоцит, например, не обуславливая апоптоз, некроз и/или старение, или не обуславливая более 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% или 40% апоптоза, некроза и/или старения, по сравнению с контрольной клеткой. В некоторых вариантах осуществления необходимый безопасный приемный локус может представлять собой локус, в котором экспрессия вставленной генной последовательности не нарушается сквозной экспрессией из соседних генов. Безопасный приемный локус может находиться в гене альбумина, таком как ген альбумина человека. Безопасный приемный локус может находиться внутри области интрона 1 альбумина, например, интрона 1 альбумина человека. Безопасный приемный локус может представлять собой безопасный приемный локус человека, например, для ткани печени или гепатоцитарной клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления безопасный приемный локус обеспечивает сверхэкспрессию экзогенного гена без существенного вредного воздействия на клетку-хозяина или популяцию клеток, таких как гепатоциты или клетки печени, например, не обуславливая апоптоз, некроз и/или старение, или не обуславливая более 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% или 40% апоптоза, некроза и/или старения, по сравнению с контрольной клеткой или популяцией

клеток.

Композиции

Композиции, содержащие гидовую РНК (гРНК)

В данном документе предложены композиции гидовых РНК и способы, применимые для вставки и экспрессии гена фактора IX в геномном локусе, например, в безопасном приемном сайте клетки-хозяина или популяции клеток-хозяев. В частности, как проиллюстрировано в данном документе, нацеливание и вставка экзогенного гена в локус альбумина (например, в интрон 1) позволяет использовать эндогенный промотор альбумина для управления устойчивой экспрессией экзогенного гена. Настоящее изобретение частично основано на идентификации гидовых РНК, которые специфически нацелены на сайты в интроне 1 гена альбумина и которые обеспечивают эффективную вставку и экспрессию гена фактора IX. Как показано в примерах и дополнительно описано в данном документе, способность идентифицированных гРНК опосредовать высокие уровни редактирования, измеряемые по активности образования инделей, неожиданно не обязательно коррелирует с использованием тех же самых гРНК для опосредования эффективной вставки трансгенов, определяемой, *например*, по экспрессии трансгена. Таким образом, определенные гРНК, которые способны обеспечивать высокий уровень образования инделей, не обязательно способны опосредовать эффективную вставку, и, наоборот, некоторые гРНК, которые, как было показано, обеспечивают низкий уровень образования инделей, могут опосредовать эффективную вставку и экспрессию трансгена.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены композиции и способы, применимые для вставки и экспрессии гена фактора IX в области локуса альбумина (например, интрона 1) клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены композиции, пригодные для введения или вставки гетерологичной нуклеиновой кислоты фактора IX в локус альбумина клетки-хозяина, например, с использованием описанной в данном документе гидовой РНК с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом и конструкцией (например, донорной конструкцией или матрицей), содержащей гетерологичную нуклеиновую кислоту фактора IX («трансген фактора IX»). В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены композиции, пригодные для экспрессии гетерологичного фактора IX из локуса альбумина клетки-хозяина, например, с использованием описанной в данном документе гидовой РНК с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом и конструкцией (например, донорной), содержащей гетерологичную нуклеиновую кислоту фактора IX. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены композиции, пригодные для экспрессии гетерологичного фактора IX из локуса альбумина клетки-хозяина, например, с использованием описанной в данном документе гидовой РНК с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом и двунаправленной конструкцией, содержащей гетерологичную нуклеиновую кислоту фактора IX. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены композиции, пригодные для индукции разрыва (например, двухцепочечного разрыва (ДЦР) или одноцепочечного разрыва

(ника)) в гене сывороточного альбумина клетки-хозяина, например, с использованием описанной в данном документе гидовой РНК с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом (например, системой CRISPR/Cas). Композиции можно использовать *in vitro* или *in vivo*, например, для лечения гемофилии.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, которая связывается или способна связываться с интроном локуса альбумина. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК связываются в области интрона 1 гена альбумина человека (SEQ ID NO: 1). Следует понимать, что не каждое основание направляющей последовательности должно связываться в указанных областях. Например, в некоторых вариантах осуществления 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более оснований последовательности гидовой РНК связываются с указанными областями. Например, в некоторых вариантах осуществления 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более смежных оснований последовательности гидовой РНК связываются с указанными областями.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК опосредуют целенаправленное разрезание РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом (например, Cas-нуклеазой) в сайте внутри интрона 1 альбумина человека (SEQ ID NO: 1). Следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления гидовые РНК содержат направляющие последовательности, которые связываются с указанными областями или способны связываться с ними.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5, 10-17, 21-27 и 29-33.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, содержащую по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, содержащую по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из

SEQ ID NO: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 и 97. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, которая составляет по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-97.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, содержащую по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5, 10-17, 21-27 и 29-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5, 10-17, 21-27 и 29-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, содержащую по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5, 10-17, 21-27 и 29-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-37, 42-49, 53-59, 61-69, 74-81, 85-91 и 93-97. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5, 10-17, 21-27 и 29-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, которая составляет по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5, 10-17, 21-27 и 29-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-37, 42-49, 53-59, 61-69, 74-81, 85-91 и 93-97.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК опосредуют целенаправленное разрезание, приводящее к двухцепочечному разрыву (ДЦР). В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК опосредуют целенаправленное разрезание, приводящее к одноцепочечному разрыву (ОЦР).

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые

РНК связываются с областью, расположенной выше мотива, примыкающего к пропоспейсеру (PAM, англ. «prospacer adjacent motif»). Как будет понятно специалистам в данной области техники, последовательность PAM находится в цепи, противоположной цепи, которая содержит целевую последовательность. Это означает, что последовательность PAM находится в цепи, комплементарной целевой цепи (цепи, которая содержит целевую последовательность, с которой связывается гидовая РНК). В некоторых вариантах осуществления PAM выбран из группы, состоящей из NGG, NNGRRT, NNGRR(N), NNAGAAW, NNNNG(A/C)TT и NNNNRYAC.

В некоторых вариантах осуществления предложенные в данном документе последовательности гидовой РНК комплементарны последовательности, смежной с последовательностью PAM.

В некоторых вариантах осуществления последовательность гидовой РНК содержит последовательность, комплементарную последовательности в геномной области, выбранной из таблиц в данном документе, в соответствии с координатами в референсном геноме человека hg38. В некоторых вариантах осуществления последовательность гидовой РНК содержит последовательность, комплементарную последовательности, которая содержит 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 последовательных нуклеотидов из геномной области, выбранной из таблиц в данном документе. В некоторых вариантах осуществления последовательность гидовой РНК содержит последовательность, комплементарную последовательности, которая содержит 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 последовательных нуклеотидов, занимающих геномную область, выбранную из таблиц в данном документе.

Описанные в данном документе гидовые РНК опосредуют целенаправленное разрезание, приводящее к двухцепочечному разрыву (ДЦР). Описанные в данном документе гидовые РНК опосредуют целенаправленное разрезание, приводящее к одноцепочечному разрыву (ОЦР или нику).

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК опосредуют целенаправленное разрезание РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом (например, Cas-нуклеазой), что приводит к вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты фактора IX в интрон 1 гена альбумина. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК и/или разрезание приводит к частоте вставки гетерологичного гена фактора IX между 30 и 35%, 35 и 40%, 40 и 45%, 45 и 50%, 50 и 55%, 55 и 60%, 60 и 65%, 65 и 70%, 70 и 75%, 75 и 80%, 80 и 85%, 85 и 90%, 90 и 95% или 95 и 99%. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК и/или разрезание приводит к частоте вставки гетерологичной нуклеиновой кислоты фактора IX, составляющей по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%. Частоту вставки можно определить *in vitro* или *in vivo*. Например, в некоторых вариантах осуществления частоту вставки можно определить путем обнаружения и измерения вставленной нуклеиновой кислоты фактора IX в популяции клеток и расчета процентной

доли популяции, которая содержит вставленную нуклеиновую кислоту фактора IX. Способы определения частоты вставки известны и доступны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК обеспечивает повышение экспрессии гетерологичного гена фактора IX на значение между 5 и 10%, 10 и 15%, 15 и 20%, 20 и 25%, 25 и 30%, 30 и 35%, 35 и 40%, 40 и 45%, 45 и 50%, 50 и 55%, 55 и 60%, 60 и 65%, 65 и 70%, 70 и 75%, 75 и 80%, 80 и 85%, 85 и 90%, 90 и 95%, 95 и 99% или более. Повышение экспрессии гетерологичного гена фактора IX можно измерить *in vitro* или *in vivo*. Например, в некоторых вариантах осуществления повышение экспрессии можно определить путем обнаружения и измерения уровня полипептида фактора IX и сравнения этого уровня с уровнем полипептида фактора IX до, например, обработки клеток или введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК обеспечивает повышение активности в результате экспрессии гетерологичного гена фактора IX на значение между 5 и 10%, 10 и 15%, 15 и 20%, 20 и 25%, 25 и 30%, 30 и 35%, 35 и 40%, 40 и 45%, 45 и 50%, 50 и 55%, 55 и 60%, 60 и 65%, 65 и 70%, 70 и 75%, 75 и 80%, 80 и 85%, 85 и 90%, 90 и 95%, 95 и 99% или более. Например, повышение активности можно определить путем обнаружения и измерения коагуляционной активности и сравнения этой активности с коагуляционной активностью до, например, обработки клеток или введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления повышение активности можно определить посредством оценки функции свертывания в анализе АЧТВ и/или образования тромбина в анализе TGA-EA. Такие методы доступны и известны в данной области техники (например, Simioni et al, NEJM 2009).

Каждая из направляющих последовательностей, приведенных в таблице 1 как SEQ ID NO: 2-33, может дополнительно содержать дополнительные нуклеотиды с образованием crРНК и/или гидовой РНК, например, со следующей типовой нуклеотидной последовательностью, следующей за направляющей последовательностью в 3' конце: GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG (SEQ ID NO: 400) в ориентации от 5' до 3'. Геномные координаты соответствуют референсному геному человека hg38. В случае ogРНК, вышеприведенные направляющие последовательности могут дополнительно содержать дополнительные нуклеотиды с образованием ogРНК, например, со следующей типовой нуклеотидной последовательностью, следующей за 3' концом направляющей последовательности:

GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA
AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 401) или
GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA
AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO: 402) в ориентации от 5' до 3'.

Каждая из направляющих последовательностей в таблице 1 в SEQ ID NO: 2-5, 10-17, 21-27 и 29-33 может дополнительно содержать дополнительные нуклеотиды с образованием crРНК, например, со следующей типовой нуклеотидной последовательностью, следующей за направляющей последовательностью в 3' конце: GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG (SEQ ID NO: 400) в ориентации от 5' до 3'. В случае

огРНК, вышеприведенные направляющие последовательности могут дополнительно содержать дополнительные нуклеотиды с образованием огРНК, например, со следующей типовой нуклеотидной последовательностью, следующей за 3' концом направляющей последовательности:

GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA
AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 401) или
GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA
AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO: 402) в ориентации от 5' до 3'.

Таблица 1: Последовательности гидовой РНК человека и хромосомные координаты

ID направляющей	Направляющая последовательность	Геномные координаты человека (hg38)	SEQ ID NO:
G009844	GAGCAACCUCACUCUUGUCU	хром4:73405113-73405133	2
G009851	AUGCAUUUGUUUCAAAAUAU	хром4:73405000-73405020	3
G009852	UGCAUUUGUUUCAAAAUAUU	хром4:73404999-73405019	4
G009857	AUUUAUGAGAUCAACAGCAC	хром4:73404761-73404781	5
G009858	GAUCAACAGCACAGGUUUUG	хром4:73404753-73404773	6
G009859	UUAAAUAAGCAUAGUGCAA	хром4:73404727-73404747	7
G009860	UAAAGCAUAGUGCAAUGGAU	хром4:73404722-73404742	8
G009861	UAGUGCAAUGGAUAGGUCUU	хром4:73404715-73404735	9
G009866	UACUAAAACUUUAUUUUACU	хром4:73404452-73404472	10
G009867	AAAGUUGAACAAUAGAAAAA	хром4:73404418-73404438	11
G009868	AAUGCAUAAUCUAAGUCAAA	хром4:73405013-73405033	12
G009874	UAAUAAAUAUCAACAUCU	хром4:73404561-73404581	13
G012747	GCAUCUUUAAAGAAUUAUUU	хром4:73404478-73404498	14
G012748	UUUGGCAUUUAUUUCUAAAA	хром4:73404496-73404516	15
G012749	UGUAUUUGUGAAGUCUACA	хром4:73404529-73404549	16
G012750	UCCUAGGUAAAAAAAAAAAA	хром4:73404577-73404597	17
G012751	UAAUUUUCUUUUGCGCACUA	хром4:73404620-73404640	18
G012752	UGACUGAAACUUCACAGAAU	хром4:73404664-73404684	19
G012753	GACUGAAACUUCACAGAAUA	хром4:73404665-73404685	20
G012754	UUCAUUUAGUCUGUCUUCU	хром4:73404803-73404823	21
G012755	AUUAUCUAAGUUUGAAUAUA	хром4:73404859-73404879	22
G012756	AAUUUUUAAAUAAGUAUUCU	хром4:73404897-73404917	23

G012757	UGAAUUAUUCUUCUGUUUAA	хром4:73404924-73404944	24
G012758	AUCAUCCUGAGUUUUUCUGU	хром4:73404965-73404985	25
G012759	UUACUAAAACUUUAUUUUAC	хром4:73404453-73404473	26
G012760	ACCUUUUUUUUUUUUUACCU	хром4:73404581-73404601	27
G012761	AGUGCAAUGGAUAGGUCUUU	хром4:73404714-73404734	28
G012762	UGAUUCCUACAGAAAAACUC	хром4:73404973-73404993	29
G012763	UGGGCAAGGGAAGAAAAAAA	хром4:73405094-73405114	30
G012764	CCUCACUCUUGUCUGGGCAA	хром4:73405107-73405127	31
G012765	ACCUCACUCUUGUCUGGGCA	хром4:73405108-73405128	32
G012766	UGAGCAACCUCACUCUUGUC	хром4:73405114-73405134	33

Гидовая РНК может дополнительно содержать trРНК. В каждом описанном в данном документе варианте осуществления композиции и способа crРНК и trРНК могут быть связаны в виде одной РНК (огРНК) или могут находиться в отдельных РНК (дгРНК). В контексте огРНК компоненты crРНК и trРНК могут быть связаны ковалентно, например, посредством фосфодиэфирной связи или другой ковалентной связи. В некоторых вариантах осуществления огРНК содержит одну или более связей между нуклеотидами, которые не являются фосфодиэфирными связями.

В каждом из описанных в данном документе вариантов осуществления композиции, применения и способа гидовая РНК может содержать две молекулы РНК в виде «двойной гидовой РНК» или «дгРНК». дгРНК содержит первую молекулу РНК, содержащую crРНК, содержащую, например, направляющую последовательность, приведенную в таблице 1, и вторую молекулу РНК, содержащую trРНК. Первая и вторая молекулы РНК могут не быть ковалентно связанными, но могут образовывать двойную спираль РНК посредством спаривания оснований между частями crРНК и trРНК.

В каждом из описанных в данном документе вариантов осуществления композиции, применения и способа гидовая РНК может содержать одну молекулу РНК в виде «одинарной гидовой РНК» или «огРНК». огРНК может содержать crРНК (или ее часть), содержащую направляющую последовательность, приведенную в таблице 1, ковалентно связанную с trРНК. огРНК может содержать 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов направляющей последовательности, приведенной в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления crРНК и trРНК ковалентно связаны посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления огРНК образует структуру типа «стебель - петля» посредством спаривания оснований между частями crРНК и trРНК. В некоторых вариантах осуществления crРНК и trРНК ковалентно связаны посредством одной или более связей, которые не являются фосфодиэфирными связями.

В некоторых вариантах осуществления trРНК может содержать всю или часть последовательности trРНК, полученной из системы CRISPR/Cas природного происхождения. В некоторых вариантах осуществления trРНК содержит усеченную или

модифицированную trРНК дикого типа. Длина trРНК зависит от используемой системы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления trРНК содержит или состоит из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более 100 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления trРНК может содержать определенные вторичные структуры, такие как, например, одна или более структур типа шпильки или стебель - петля, или одна или более структур с выпетливанием.

В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность или область в интроне 1 локуса альбумина человека (SEQ ID NO: 1) может быть комплементарной направляющей последовательности гидовой РНК. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности или идентичности между направляющей последовательностью гидовой РНК и соответствующей ей целевой последовательностью может составлять по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность и направляющая последовательность гРНК могут быть на 100% комплементарными или идентичными. В других вариантах осуществления целевая последовательность и направляющая последовательность гРНК могут содержать по меньшей мере одно несовпадение. Например, целевая последовательность и направляющая последовательность гРНК могут содержать 1, 2, 3, 4 или 5 несовпадений, при этом общая длина гидовой последовательности составляет около 20 или 20. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность и направляющая последовательность гРНК могут содержать 1-4 несовпадения, при этом длина гидовой последовательности составляет около 20 или 20 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе композиция или состав содержат мРНК, содержащую открытую рамку считывания (ОРС), кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas-нуклеаза, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления предложена, применяется или вводится мРНК, содержащая ОРС, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas-нуклеаза.

Модифицированные гРНК и мРНК

В некоторых вариантах осуществления гРНК химически модифицирована. гРНК, содержащая один или более модифицированных нуклеозидов или нуклеотидов, называется «модифицированной» гРНК или «химически модифицированной» гРНК для описания наличия одного или более неприродных и/или природных компонентов или конфигураций, используемых вместо или в дополнение к каноническим остаткам А, G, C и U. В некоторых вариантах осуществления модифицированную гРНК синтезируют с неканоническим нуклеозидом или нуклеотидом, что в данном документе называется «модифицированным». Модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды могут включать одно или более из: (i) изменения, например, замены одного или обоих несвязывающих фосфатных атомов кислорода и/или одного или более связывающих фосфатных атомов кислорода в связи фосфодиэфирного остова (типичная модификация остова); (ii)

изменения, например, замены составляющего компонента сахара рибозы, например 2'-гидроксила в сахаре рибозы (типовая модификация сахара); (iii) полной замены фосфатного фрагмента «дефосфо»-линкерами (типовая модификация остова); (iv) модификации или замены нуклеосахаридного природного происхождения, в том числе неканоническим нуклеосахаридом (типовая модификация основания); (v) замены или модификации рибозо-фосфатного остова (типовая модификация остова); (vi) модификации 3' конца или 5' конца олигонуклеотида, например, удаление, модификацию или замену концевой фосфатной группы или конъюгацию фрагмента, кэпа или линкера (такие модификации 3' или 5' кэпа могут включать модификацию сахара и/или остова); и (vii) модификации или замены сахара (типовая модификация сахара).

Химические модификации, такие как перечисленные выше, можно комбинировать, чтобы получить модифицированные гРНК и/или мРНК, содержащих нуклеозиды и нуклеотиды (вместе «остатки»), которые могут иметь две, три, четыре или более модификаций. Например, модифицированный остаток может содержать модифицированный сахар и модифицированное нуклеосахаридное основание. В некоторых вариантах осуществления каждое основание гРНК модифицировано, например, все основания имеют модифицированную фосфатную группу, такую как тиофосфатная группа. В некоторых вариантах осуществления все или практически все фосфатные группы молекулы гРНК заменены тиофосфатными группами. В некоторых вариантах осуществления модифицированные гРНК содержат по меньшей мере один модифицированный остаток в 5' конце РНК или вблизи него. В некоторых вариантах осуществления модифицированные гРНК содержат по меньшей мере один модифицированный остаток в 3' конце РНК или вблизи него. Определенные гРНК содержат по меньшей мере один модифицированный остаток в 5' конце и 3' конце РНК или вблизи них.

В некоторых вариантах осуществления гРНК содержит один, два, три или более модифицированных остатков. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 5% (например, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100%) позиций в модифицированной гРНК представлены модифицированными нуклеозидными или нуклеотидными.

Немодифицированные нуклеиновые кислоты могут быть подвержены деградации, например, внутриклеточными нуклеазами или сывороточными нуклеазами. Например, нуклеазы могут гидролизовать фосфодиэфирные связи нуклеиновых кислот. Соответственно, в одном аспекте описанные в данном документе гРНК могут содержать один или более модифицированных нуклеозидов или нуклеотидов, например, для придания стабильности по отношению к внутриклеточным нуклеазам или сывороточным нуклеазам. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе

модифицированные молекулы гРНК могут демонстрировать сниженный врожденный иммунный ответ при внесении в популяцию клеток как *in vivo*, *in vivo* и *ex vivo*. Термин «врожденный иммунный ответ» включает клеточный ответ на экзогенные нуклеиновые кислоты, включая одноцепочечные нуклеиновые кислоты, который включает индукцию экспрессии и высвобождения цитокинов, в частности интерферонов, и гибель клеток.

В некоторых вариантах осуществления модификации остова фосфатная группа модифицированного остатка может быть модифицирована путем замены одного или более атомов кислорода другим заместителем. Кроме того, модифицированный остаток, например, модифицированный остаток, присутствующий в модифицированной нуклеиновой кислоте, может характеризоваться полной заменой немодифицированного фосфатного фрагмента модифицированной фосфатной группой, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления модификация основной цепи фосфатной основной цепи может включать изменения, которые приводят к получению незаряженного линкера или заряженного линкера с несимметричным распределением заряда.

Примеры модифицированных фосфатных групп включают тиофосфат, фосфороселенаты, боранофосфаты, сложные эфиры боранофосфатов, гидрофосфонаты, фосфороамидаты, алкил- или арилфосфонаты и фосфотриэфиры. Атом фосфора в немодифицированной фосфатной группе является ахиральным. Однако замена одного из мостиковых атомов кислорода одним из вышеуказанных атомов или групп атомов может сделать атом фосфора хиральным. Стереогенный атом фосфора может иметь конфигурацию «R» (в данном документе Rp) или конфигурацию «S» (в данном документе Sp). Остов также можно модифицировать путем замены мостикового кислорода (т. е. кислорода, который связывает фосфат с нуклеозидом) на азот (мостиковые фосфорамидааты), серу (мостиковые тиофосфаты) и углерод (мостиковые метиленфосфонаты). Замена может происходить либо в связывающем атоме кислорода, либо в обоих связывающих атомах кислорода.

В определенных модификациях остова фосфатная группа может быть заменена не содержащими фосфор соединителями. В некоторых вариантах осуществления заряженная фосфатная группа может быть заменена нейтральным фрагментом. Примеры фрагментов, которые могут заменять фосфатную группу, могут включать, без ограничения, например, метилфосфонат, гидроксиламино, силоксан, карбонат, карбоксиметил, карбамат, амид, тиоэфир, линкер на основе этиленоксида, сульфонат, сульфонамид, тиоформацеталь, формацеталь, оксим, метиленимино, метиленметиличино, метиленгидразо, метилендиметилгидразо и метиленоксиметиличино.

Также можно конструировать каркасы, которые могут имитировать нуклеиновые кислоты, в которых фосфатный линкер и сахар рибозы заменены нуклеозидными или нуклеотидными суррогатами, устойчивыми к нуклеазам. Такие модификации могут включать модификации остова и сахара. В некоторых вариантах осуществления нуклеосооснования могут быть плотно связаны посредством суррогатного остова. Примеры

могут включать, без ограничения, суррогаты нуклеозидов морфолино, циклобутила, пирролидина и пептидной нуклеиновой кислоты (ПНК).

Модифицированные нуклеозиды и модифицированные нуклеотиды могут содержать одну или более модификаций группы сахара, т. е. модификации сахара. Например, 2'-гидроксильная группа (ОН) может быть модифицирована, например, заменена рядом разных «окси»- или «дезокси»-заместителей. В некоторых вариантах осуществления модификации 2'-гидроксильной группы могут повысить стабильность нуклеиновой кислоты, поскольку гидроксил уже невозможно депротонировать с образованием 2'-алкоксидного иона.

Примеры модификаций 2'-гидроксильных групп могут включать алкокси или арилокси (OR, где «R» может представлять собой, например, алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар); полиэтиленгликоли (ПЭГ), $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$, где R может представлять собой, например, H или необязательно замещенный алкил, а n может представлять собой целое число от 0 до 20 (например, от 0 до 4, от 0 до 8, от 0 до 10, от 0 до 16, от 1 до 4, от 1 до 8, от 1 до 10, от 1 до 16, от 1 до 20, от 2 до 4, от 2 до 8, от 2 до 10, от 2 до 16, от 2 до 20, от 4 до 8, от 4 до 10, от 4 до 16 и от 4 до 20). В некоторых вариантах осуществления модификация 2'-гидроксильной группы может представлять собой 2'-O-Me. В некоторых вариантах осуществления модификация 2'-гидроксильной группы может представлять собой 2'-фтор-модификацию, которая состоит в замене 2'-гидроксильной группы фторидом. В некоторых вариантах осуществления модификация 2'-гидроксильной группы может представлять собой 2'-H, которая состоит в замене 2'-гидроксильной группы водородом. В некоторых вариантах осуществления модификация 2'-гидроксильной группы может включать «запертые» нуклеиновые кислоты (ЗНК), в которых 2'-гидроксил может быть соединен, например, посредством C_{1-6} алкиленового или C_{1-6} гетероалкиленового мостика, с 4'-атомом углерода того же рибозного сахара, где типовые мостики могут включать метиленовые, пропиленовые, эфирные или аминные мостики; O-амино (где амино может представлять собой, например, NH_2 ; алкиламино, диалкиламино, гетероциклил, ариламино, диариламино, гетероариламино или дигетероариламино, этилендиамин или полиамино) и аминококси, $O(CH_2)_n$ -амино (где амино может представлять собой, например, NH_2 ; алкиламино, диалкиламино, гетероциклил, ариламино, диариламино, гетероариламино или дигетероариламино, этилендиамин или полиамино). В некоторых вариантах осуществления модификация 2'-гидроксильной группы может включать «открытые» нуклеиновые кислоты (ОНК), в которых в рибозном кольце отсутствует связь $C2'-C3'$. В некоторых вариантах осуществления модификация 2'-гидроксильной группы может включать метоксиэтильную группу (МОЭ), $OCH_2CH_2OCH_3$, например, производное ПЭГ).

«Дезокси»-2'-модификации могут включать водород (т. е. сахара дезоксирибозы, например, в выступающих частях частично дцРНК); галоген (например, бром, хлор, фтор или йод); амино (где амино может представлять собой, например, NH_2 ; алкиламино, диалкиламино, гетероциклил, ариламино, диариламино, гетероариламино,

дигетероариламино или аминокислоту; $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_n\text{CH}_2\text{CH}_2$ - амино (где амино может быть, например таким, как описано в данном документе), $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}$ (где R может представлять собой, например, алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар), циано; меркапто; алкилтиоалкил; тиоалкокси; и алкил, циклоалкил, арил, алкенил и алкинил, которые могут быть необязательно замещены, например, амино, как описано в данном документе.

Модификация сахара может включать сахарную группу, которая также может содержать один или более атомов углерода, которые обладают стереохимической конфигурацией, противоположной конфигурации соответствующего атома углерода в рибозе. Таким образом, модифицированная нуклеиновая кислота может содержать нуклеотиды, содержащие, например, арабинозу в качестве сахара. Модифицированные нуклеиновые кислоты могут также содержать абазические сахара. Эти абазические сахара также могут быть дополнительно модифицированы в одном или более составляющих сахар атомах. Модифицированные нуклеиновые кислоты могут также содержать один или более сахаров в L-форме, например, L-нуклеозиды.

Описанные в данном документе модифицированные нуклеозиды и модифицированные нуклеотиды, которые могут быть включены в модифицированную нуклеиновую кислоту, могут содержать модифицированное основание, также называемое нуклеооснованием. Примеры нуклеооснований включают, но не ограничиваются этим, аденин (A), гуанин (G), цитозин (C) и урацил (U). Эти нуклеооснования могут быть модифицированы или полностью заменены для получения модифицированных остатков, которые могут быть включены в модифицированные нуклеиновые кислоты. Нуклеооснование нуклеотида может быть независимо выбрано из пурина, пиримидина, аналога пурина или аналога пиримидина. В некоторых вариантах осуществления нуклеооснование может включать, например, встречающиеся в природе и синтетические производные основания.

В вариантах осуществления, в которых используется двойная гидовая РНК, каждая из *cr*РНК и *tracr*-РНК может содержать модификации. Такие модификации могут находиться в одном или обоих концах *cr*РНК и/или *tracr*РНК. В вариантах осуществления, включающих *og*РНК, один или более остатков в одном или обоих концах *og*РНК могут быть химически модифицированы, и/или внутренние нуклеозиды могут быть модифицированы, и/или вся *og*РНК может быть химически модифицирована. Некоторые варианты осуществления включают модификацию 5' конца. Некоторые варианты осуществления включают модификацию 3' конца.

В некоторых вариантах осуществления гидовые РНК, описанные в данном документе, имеют один из профилей модификации, описанных в WO2018/107028 A1, поданной 8 декабря 2017 г., под названием «Chemically Modified Guide RNAs» («Химически модифицированные гидовые РНК»), содержание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления гидовые РНК, описанные в данном документе, имеют один из профилей

структуры/модификации, описанных в US20170114334, содержание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления гидовые РНК, описанные в данном документе, имеют один из профилей структуры/модификации, описанных в WO2017/136794, WO2017004279, US2018187186, US2019048338, содержание которых в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления огРНК по настоящему изобретению имеет профили модификации, приведенные ниже в таблице 2. «Полная последовательность» в таблице 2 относится к последовательности огРНК для каждой из направляющих, перечисленных в таблице 1. «Полная модифицированная последовательность» представляет профиль модификации для каждой огРНК.

Таблица 2: огРНК и профили модификации для огРНК направляющих последовательностей альбумина человека

ID направляющей	Полная последовательность	SEQ ID NO:	Модифицированная полная последовательность	SEQ ID NO:
G009844	GAGCAACCUCACUC UUGUCUGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	34	mG*mA*mG*CAACCUCA CUCUUGUCUGU UUUAGAmGmCmUmAmG mAmAmAmUm AmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCC GUUAUCAmAmCmUmUm GmAmAmAmAm AmGmUmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU*mU *mU*mU	66
G009851	AUGCAUUUGUUUCA AAAUAUGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	35	mA*mU*mG*CAUUUGUU UCAAAUAUG UUUUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUm AmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCG UUAUCAmAmCmUmUmG mAmAmAmAmAm	67

			GmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*m U*mU	
G009852	UGCAUUUGUUUCA AAUAUUGUUUU AGAGCUAGAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	36	mU*mG*mC*AUUUGUUU CAAAAUAUUGU UUUAGAmGmCmUmAmG mAmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAG GCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU*mU *mU*mU	68
G009857	AUUUAUGAGAUCAA CAGCACGUUUU AGAGCUAGAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	37	mA*mU*mU*UAUGAGAU CAACAGCACGU UUUAGAmGmCmUmAmG mAmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAG GCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGm AmGmUmCmGmGmUmGm CmU*mU*mU*mU	69
G009858	GAUCAACAGCACAG GUUUUGGUUUU AGAGCUAGAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	38	mG*mA*mU*CAACAGCA CAGGUUUUGGU UUUAGAmGmCmUmAmG mAmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAG GCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGm	70

			AmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*m U	
G009859	UAAAUAAGCAUA GUGCAAGUUUU AGAGCUAGAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	39	mU*mU*mA*AAUAAAGC AUAGUGCAAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	71
G009860	UAAAGCAUAGUGCA AUGGAUGUUUU AGAGCUAGAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	40	mU*mA*mA*AGCAUAGU GCAAUGGAUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	72
G009861	UAGUGCAAUGGAUA GGUCUUGUUUU AGAGCUAGAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	41	mU*mA*mG*UGCAAUGG AUAGGUCUUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	73
G009866	UACUAAAACUUUAU UUUACUGUUUU	42	mU*mA*mC*UAAAACUU UAUUUUACUGUUUUAG	74

	AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU		AmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G009867	AAAGUUGAACAAUA GAAAAAGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	43	mA*mA*mA*GUUGAACA AUAGAAAAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	75
G009868	AAUGCAUAAUCUAA GUCAAAGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	44	mA*mA*mU*GCAUAAUC UAAGUCAAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	76
G009874	UAAUAAAAUUCAAA CAUCCUGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG	45	mU*mA*mA*UAAAAUUC AAACAUCCUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGm	77

	UCGGUGCUUUU		GmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G012747	GCAUCUUUAAAGAA UUAUUUGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	46	mG*mC*mA*UCUUUAAA GAAUUUUUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	78
G012748	UUUGGCAUUUAAUUU CUAAAAGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	47	mU*mU*mU*GGCAUUUA UUUCUAAAAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	79
G012749	UGUAUUUGUGAAGU CUUACAGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	48	mU*mG*mU*AUUUGUGA AGUCUUACAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	80
G012750	UCCUAGGUAAAAAA AAAAAAGUUUU	49	mU*mC*mC*UAGGUAAA AAAAAAAAGUUUUAG	81

	AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU		AmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G012751	UAAUUUUCUUUUGC GCACUAGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	50	mU*mA*mA*UUUUCUUU UGCGCACUAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	82
G012752	UGACUGAAACUUCA CAGAAUGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	51	mU*mG*mA*CUGAAACU UCACAGAAUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	83
G012753	GACUGAAACUUCAC AGAAUAGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG	52	mG*mA*mC*UGAAACUU CACAGAAUAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGm	84

	UCGGUGCUUUU		GmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G012754	UUCAUUUUAGUCUG UCUUCUGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	53	mU*mU*mC*AUUUUAGU CUGUCUUCUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	85
G012755	AUUAUCUAAGUUUG AAUAUAGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	54	mA*mU*mU*AUCUAAGU UUGAAUAUAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	86
G012756	AAUUUUUAAAAUAG UAUUCUGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	55	mA*mA*mU*UUUUAAAA UAGUAUUCUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	87
G012757	UGAAUUAUUCUUCU GUUUAAGUUUU	56	mU*mG*mA*AUUAUUCU UCUGUUUAAGUUUUAG	88

	AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU		AmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G012758	AUCAUCCUGAGUUU UUCUGUGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	57	mA*mU*mC*AUCCUGAG UUUUUCUGUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	89
G012759	UUACUAAAACUUUA UUUUACGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	58	mU*mU*mA*CUAAAACU UUUUUUACGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	90
G012760	ACCUUUUUUUUUUU UUUACCUGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG	59	mA*mC*mC*UUUUUUUU UUUUUACCUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGm	91

	UCGGUGCUUUU		GmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G012761	AGUGCAAUGGAUAG GUCUUUGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	60	mA*mG*mU*GCAAUGGA UAGGUCUUUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	92
G012762	UGAUUCCUACAGAA AAACUCGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	61	mU*mG*mA*UCCUACA GAAAAACUCGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	93
G012763	UGGGCAAGGAAGA AAAAAAGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	62	mU*mG*mG*GCAAGGGA AGAAAAAAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	94
G012764	CCUCACUCUUGUCU GGGCAAGUUUU	63	mC*mC*mU*CACUCUUG UCUGGGCAAGUUUUAG	95

	AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUA AAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU		AmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G012765	ACCUCACUCUUGUC UGGGCAGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUA AAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	64	mA*mC*mC*UCACUCUU GUCUGGGCAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	96
G012766	UGAGCAACCUCACU CUUGUCGUUUU AGAGCUAGAAAUAG CAAGUUA AAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	65	mU*mG*mA*GCAACCUC ACUCUUGUCGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	97

В некоторых вариантах осуществления модифицированная оРНК содержит следующую последовательность:
mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUm
AmGmCAAGUUA AAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmA
mGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (SEQ ID
NO: 300), где «N» может представлять собой любой природный или неприродный
нуклеотид, а совокупность N составляет направляющую последовательность интрона 1
альбумина, описанную в таблице 1. Например, сюда входит SEQ ID NO: 300, где N

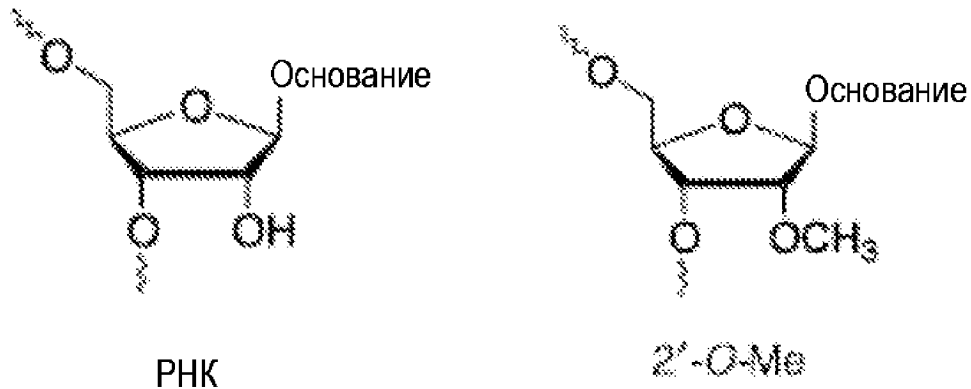
заменены на любую из направляющих последовательностей, описанных в данном документе в таблице 1 (SEQ ID NO: 2-33).

Например, сюда входит SEQ ID NO: 300, где N заменены на любую из направляющих последовательностей, описанных в данном документе в таблице 1 (SEQ ID NO: 2-5, 10-17, 21-27 и 29-33).

Любая из модификаций, описанных ниже, может присутствовать в гРНК и мРНК, описанных в данном документе.

Термины «mA», «mC», «mU» или «mG» можно использовать для обозначения нуклеотида, который был модифицирован с помощью 2'-O-Me.

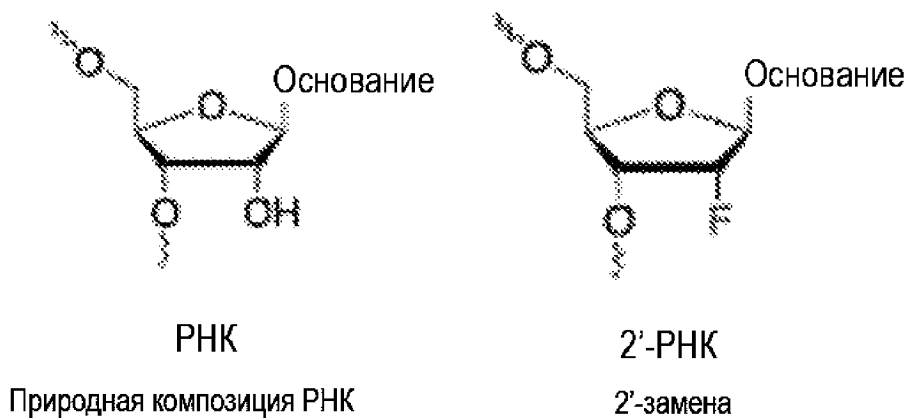
Модификацию 2'-O-метила можно проиллюстрировать следующим образом:



Другой химической модификацией, которая, как было показано, влияет на сахарные кольца нуклеотидов, является замещение галогеном. Например, замена 2'-фтор (2'-F) в сахарных кольцах нуклеотидов может повысить аффинность связывания олигонуклеотидов и стойкость к нуклеазам.

В данной заявке термины «fA», «fC», «fU» или «fG» можно использовать для обозначения нуклеотида, который был замещен 2'-F.

Замену 2'-F можно проиллюстрировать следующим образом:



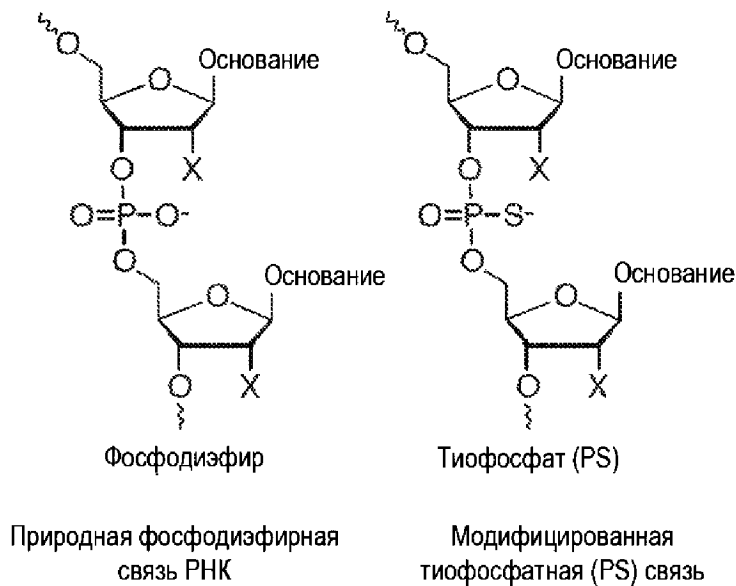
Тиофосфатная (PS) связь относится к связи, в которой атом серы замещен одним немостиковым фосфатным атомом кислорода в фосфодиэфирной связи, например, в связях между нуклеотидными основаниями. Когда тиофосфаты используют для создания

олигонуклеотидов, модифицированные олигонуклеотиды также можно называть S-олигонуклеотидами.

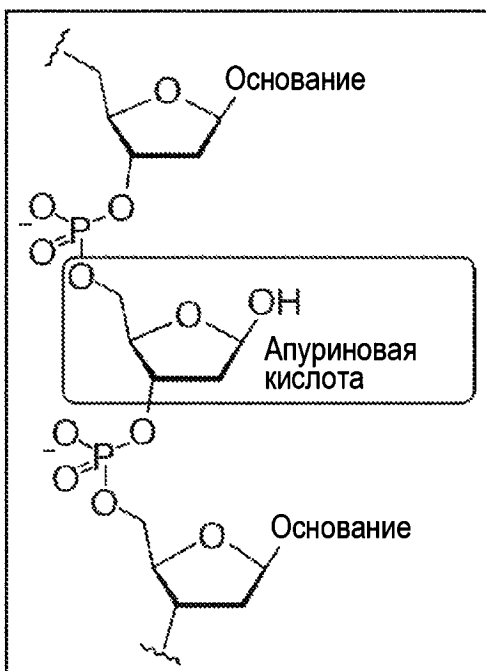
«*» можно использовать для обозначения модификации PS. В этой заявке термины A*, C*, U* или G* можно использовать для обозначения нуклеотида, связанного со следующим (например, 3') нуклеотидом посредством связи PS.

В этой заявке термины «mA*», «mC*», «mU*» или «mG*» можно использовать для обозначения нуклеотида, замещенного 2'-O-Me и связанного со следующим (например, 3') нуклеотидом посредством связи PS.

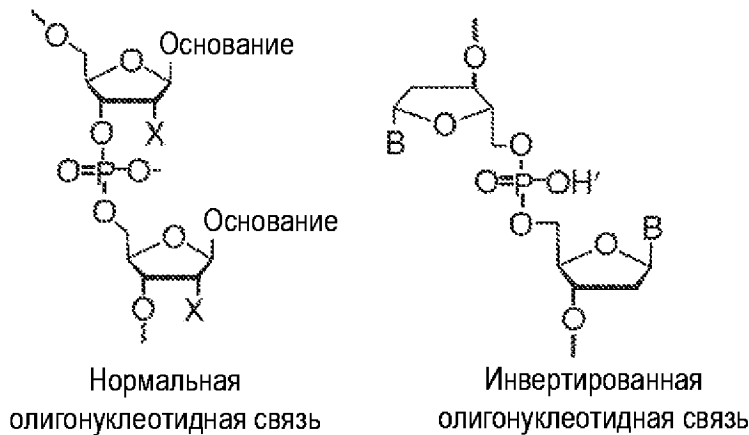
На диаграмме ниже проиллюстрировано замещение S- на немостииковый фосфатный атом кислорода с образованием связи PS вместо фосфодиэфирной связи:



Абазические нуклеотиды относятся к нуклеотидам, в которых отсутствуют азотистые основания. На фигуре ниже изображен олигонуклеотид с абазическим (также известным как апуриновый) сайтом, в котором отсутствует основание:



Инвертированные основания относятся к тем, связи которых инвертированы относительно нормальной связи 5' с 3' (т. е. связь 5' с 5' или связь 3' с 3'). Например:



Абазический нуклеотид может быть присоединен посредством инвертированной связи. Например, абазический нуклеотид может быть присоединен к концевому 5' нуклеотиду посредством связи 5' с 5', или абазический нуклеотид может быть присоединен к концевому 3' нуклеотиду посредством связи 3' с 3'. Инвертированный абазический нуклеотид в концевом 5' или 3' нуклеотиде также может называться инвертированным абазическим концевым кэпом.

В некоторых вариантах осуществления модифицированы один или более из первых трех, четырех или пяти нуклеотидов в 5' конце и один или более из последних трех, четырех или пяти нуклеотидов в 3' конце. В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой 2'-O-Me, 2'-F, инвертированный абазический нуклеотид, связь PS или другую нуклеотидную модификацию, хорошо известную в данной области техники, для повышения стабильности и/или эффективности.

В некоторых вариантах осуществления первые четыре нуклеотида в 5' конце и последние четыре нуклеотида на 3' конце связаны тиофосфатными (PS) связями.

В некоторых вариантах осуществления первые три нуклеотида в 5' конце и последние три нуклеотида в 3' конце содержат модифицированный 2'-O-метил (2'-O-Me) нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления первые три нуклеотида в 5' конце и последние три нуклеотида в 3' конце содержат модифицированный 2'-фтором (2'-F) нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления первые три нуклеотида в 5' конце и последние три нуклеотида в 3' конце содержат инвертированный абазический нуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит модифицированную оРНК. В некоторых вариантах осуществления оРНК имеет профиль модификации, приведенный в SEQ ID NO: 300, где N представляет собой любой природный или неприродный нуклеотид, и где совокупность N составляет направляющую последовательность, которая направляет нуклеазу к целевой последовательности в интроне 1 альбумина человека, например, как показано в таблице 1.

В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит оРНК, приведенную в любой из SEQ ID NO: 34-97. В некоторых вариантах осуществления

гидовая РНК содержит огРНК, содержащую любую из направляющих последовательностей SEQ ID NO: 2-33 и нуклеотидов SEQ ID NO: 300, где нуклеотиды SEQ ID №: 300 находятся в 3' конце направляющей последовательности и где огРНК может быть модифицирована, например, как показано в SEQ ID NO: 300.

В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит огРНК, приведенную в любой из SEQ ID NO: 34-37, 42-49, 53-59, 61-69, 74-81, 85-91 и 93-97. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит огРНК, содержащую любую из направляющих последовательностей SEQ ID NO: 2-5, 10-17, 21-27 и 29-33 и нуклеотидов SEQ ID NO: 300, где нуклеотиды SEQ ID №: 300 находятся в 3' конце направляющей последовательности и где огРНК может быть модифицирована, например, как показано в SEQ ID NO: 300.

Как отмечено выше, в некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе композиция или состав содержат мРНК, содержащую открытую рамку считывания (ОРС), кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas-нуклеаза, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления предложена, применяется или вводится мРНК, содержащая ОРС, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas-нуклеаза. Как описано ниже, мРНК, содержащая Cas-нуклеазу, может содержать Cas9-нуклеазу, такую как Cas9-нуклеаза *S. pyogenes*, обладающая кливазной, никазой и/или сайт-специфической ДНК-связывающей активностью. В некоторых вариантах осуществления ОРС, кодирующая РНК-направляемую ДНК-нуклеазу, представляет собой «ОРС модифицированного РНК-направляемого ДНК-связывающего агента» или просто «модифицированную ОРС», что используют как сокращение для обозначения того, что ОРС модифицирована.

ОРС Cas9, включая модифицированные ОРС Cas9, приведены в данном документе и известны в данной области техники. В качестве одного примера, ОРС Cas9 может быть кодон-оптимизирована так, чтобы кодирующая последовательность содержала один или более альтернативных кодонов для одной или более аминокислот. В контексте данного документа термин «альтернативный кодон» относится к вариациям в частоте использования кодонов для заданной аминокислоты и может быть или не быть предпочтительным или оптимизированным кодоном (кодон-оптимизированным) для заданной экспрессионной системы. Предпочтительное использование кодонов или кодоны, которые наиболее допустимы в заданной экспрессионной системе, известны в данной области техники. Кодирующие последовательности Cas9, мРНК Cas9 и последовательности белка Cas9 из WO2013/176772, WO2014/065596, WO2016/106121 и WO2019/067910 включены в данный документ посредством ссылки. В частности, ОРС и аминокислотные последовательности Cas9 из таблицы в параграфе [0449] WO2019/067910, а также мРНК и ОРС Cas9 из параграфов [0214] - [0234] WO2019/067910 включены в данный документ посредством ссылки.

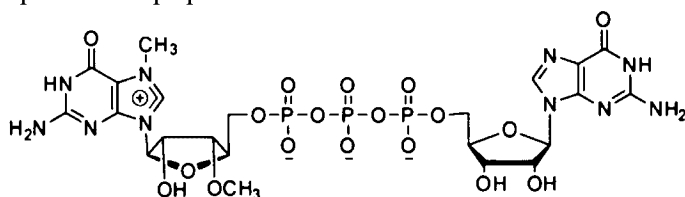
В некоторых вариантах осуществления модифицированная ОРС может содержать модифицированный уридин по меньшей мере в одном, в нескольких или всех позициях

уридина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой уридин, модифицированный в позиции 5, например, галогеном, метилом или этилом. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой псевдоуридин, модифицированный в позиции 1, например, галогеном, метилом или этилом. Модифицированный уридин может представлять собой, например, псевдоуридин, N1-метил-псевдоуридин, 5-метоксиуридин, 5-йодуридин или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой 5-метоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой 5-йодуридин. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой псевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой N1-метил-псевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой комбинацию псевдоуридина и N1-метил-псевдоуридина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой комбинацию псевдоуридина и 5-метоксиуридина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой комбинацию N1-метил-псевдоуридина и 5-метоксиуридина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой комбинацию 5-йодуридина и N1-метил-псевдоуридина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой комбинацию псевдоуридина и 5-йодуридина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой комбинацию 5-йодуридина и 5-метоксиуридина.

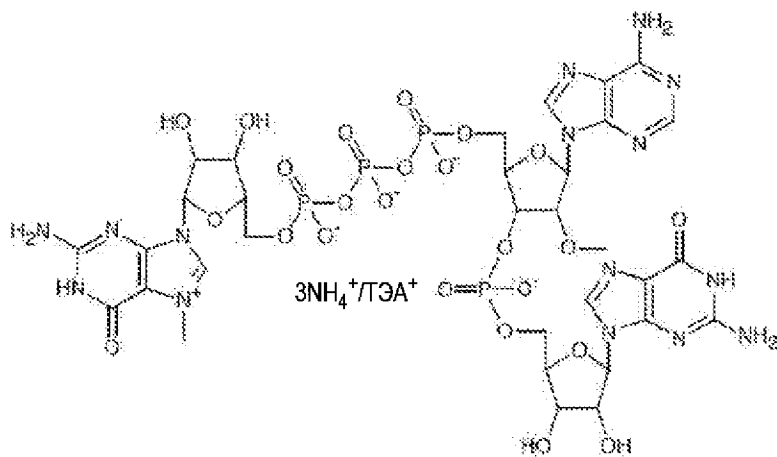
В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе мРНК содержит 5'-кэп, такой как Cap0, Cap1 или Cap2. 5'-кэп обычно представляет собой рибонуклеотид 7-метилгуанина (который может быть дополнительно модифицирован, как обсуждается ниже, например, в отношении ARCA), связанный посредством 5'-трифосфата с 5'-позицией первого нуклеотида 5'-к-3' цепи мРНК, т. е. первый кэп-проксимальный нуклеотид. В Cap0 рибозы первого и второго кэп-проксимальных нуклеотидов мРНК содержат 2'-гидроксил. В Cap1 рибозы первого и второго транскрибируемых нуклеотидов мРНК содержат 2'-метокси и 2'-гидроксил, соответственно. В Cap2 рибозы первого и второго кэп-проксимальных нуклеотидов мРНК содержат 2'-метокси. Смотрите, например, Katibah et al. (2014) Proc Natl Acad Sci USA 111(33):12025-30; Abbas et al. (2017) Proc Natl Acad Sci USA 114(11):E2106-E2115. Большинство эндогенных мРНК высших эукариот, включая мРНК млекопитающих, такие как мРНК человека, содержат Cap1 или Cap2. Cap0 и другие кэп-структуры, отличные от Cap1 и Cap2, могут быть иммуногенными у млекопитающих, таких как люди, вследствие распознавания их как «чужих» компонентами врожденной иммунной системы, такими как IFIT-1 и IFIT-5, что может привести к повышению уровня цитокинов, включая интерферон I типа. Компоненты врожденной иммунной системы, такие как IFIT-1 и IFIT-5, также могут конкурировать с eIF4E за связывание мРНК с кэпом, отличным от Cap1 или Cap2,

потенциально ингибируя трансляцию мРНК.

Кэп может быть включен котранскрипционно. Например, ARCA (англ. «anti-reverse cap analog»; Thermo Fisher Scientific, кат. № AM8045) представляет собой аналог кэпа, содержащий 7-метилгуанин-3'-метокси-5'-трифосфат, связанный с 5'-позицией рибонуклеотида гуанина, который может быть включен в транскрипт *in vitro* при инициации. ARCA приводит к получению кэпа Cap0, в котором 2'-позиция первого кэп-проксимального нуклеотида является гидроксилем. Смотрите, например, Stepinski et al., (2001) "Synthesis and properties of mRNAs containing the novel 'anti-reverse' cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl(3'-deoxy)GpppG," RNA 7: 1486-1495. Структура ARCA проиллюстрирована ниже.



CleanCap™ AG (m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG; TriLink Biotechnologies, кат. № N-7113) или CleanCap™ GG (m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG; TriLink Biotechnologies, кат. № N-7133) можно использовать для котранскрипционного обеспечения структуры Cap1. 3'-О-метилованные версии CleanCap™ AG и CleanCap™ GG также доступны от TriLink Biotechnologies под кат. №№ N-7413 и N-7433, соответственно. Структура CleanCap™ AG проиллюстрирована ниже.



В альтернативном варианте кэп можно добавлять к РНК посттранскрипционно. Например, кэпирующий фермент осповакцины коммерчески доступен (New England Biolabs, кат. № M2080S) и обладает активностью РНК-трифосфатазы и гуанилилтрансферазы, обеспечиваемой субъединицей D1, и активностью гуанинметилтрансферазы, обеспечиваемой субъединицей D12. Таким образом, он может добавлять 7-метилгуанин к РНК с образованием Cap0 в присутствии S-аденозилметионина и ГТФ. Смотрите, например, Guo, P. and Moss, B. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4023-4027; Mao, X. and Shuman, S. (1994) J. Biol. Chem. 269, 24472-24479.

В некоторых вариантах осуществления мРНК дополнительно содержит

полиаденилированный (поли-А) хвост. В некоторых вариантах осуществления поли-А-хвост содержит по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 оснований аденина, необязательно, до 300 оснований аденина. В некоторых вариантах осуществления поли-А-хвост содержит по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов аденина.

С. Донорные конструкции

Композиции и способы, описанные в данном документе, включают применение конструкции нуклеиновой кислоты, которая содержит последовательность, кодирующую гетерологичный ген фактора IX, для вставки в сайт надреза, созданный гидовой РНК по настоящему изобретению и РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом. В контексте данного документа такую конструкцию иногда называют «донорной конструкцией/матрицей». В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой ДНК-конструкцию. Способы конструирования и создания различных функциональных/структурных модификаций донорных конструкций известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления конструкция может содержать любое одно или более из хвостовой последовательности полиаденилирования, сигнальной последовательности полиаденилирования, акцепторного сайта сплайсинга или селективного маркера. В некоторых вариантах осуществления хвостовая последовательность полиаденилирования кодируется, например, в виде участка «поли-А» в 3' конце кодирующей последовательности. Способы конструирования подходящей хвостовой последовательности полиаденилирования и/или сигнальной последовательности полиаденилирования хорошо известны в данной области техники. Например, сигнальную последовательность полиаденилирования AAUAAA (SEQ ID NO: 800) обычно используют в системах млекопитающих, хотя были идентифицированы такие варианты, как UAUAAA (SEQ ID NO: 801) или AU/GUAAA (SEQ ID NO: 802). Смотрите, например, NJ Proudfoot, *Genes & Dev.* 25(17):1770-82, 2011.

В некоторых вариантах осуществления донорная конструкция содержит последовательность, кодирующую фактор IX, причем последовательность фактора IX представляет собой фактор IX дикого типа, например, SEQ ID NO: 700. В некоторых вариантах осуществления донорная конструкция содержит последовательность, кодирующую фактор IX, причем последовательность фактора IX представляет собой фактор IX дикого типа, например, SEQ ID NO: 701. В некоторых вариантах осуществления последовательность кодирует вариант фактора IX. Например, вариант может обладать большей коагуляционной активностью, чем фактор IX дикого типа. Например, вариантный фактор IX может содержать одну или более мутаций, таких как аминокислотная замена в позиции R338 (например, R338L), по сравнению с SEQ ID NO: 701. В некоторых вариантах осуществления последовательность кодирует вариант фактора IX, который является на 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 99% идентичным SEQ ID NO: 700, SEQ ID NO: 701 или SEQ ID NO: 702, имеющими по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, 100% или более активности по сравнению с фактором IX дикого типа. В некоторых вариантах осуществления последовательность кодирует

фрагмент фактора IX, причем фрагмент обладает по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, 100% или более активности по сравнению с фактором IX дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления донорная конструкция содержит последовательность, кодирующую вариант фактора IX, причем вариант фактора IX активирует коагуляцию в отсутствие своего кофактора, фактора VIII. Такие варианты фактора IX могут дополнительно поддерживать активность фактора IX дикого типа. Такие варианты фактора IX можно использовать для лечения гемофилии, такой как гемофилия В. Например, такой вариант фактора IX может содержать аминокислотную замену в позиции L6, V181, K265, I383, E185 или их комбинацию по сравнению с фактором IX дикого типа (например, по сравнению с SEQ ID NO: 701). Например, такой вариант фактора IX может содержать мутацию L6F, мутацию V181I, мутацию K265A, мутацию I383V, мутацию E185D или их комбинацию по сравнению с фактором IX дикого типа (например, по сравнению с SEQ ID NO: 701).

В одном примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях L6 и V181. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях L6 и K265. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях L6 и I383. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях L6 и E185. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях V181 и K265. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях V181 и I383. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях V181 и E185. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях K265 и I383. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях K265 и E185. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях I383 и E185. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях L6, V181 и K265. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях L6, V181 и I383. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях L6, V181 и E185. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях L6, K265 и I383. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях L6, K265 и E185. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях L6, I383 и E186. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях V181, K265 и I383. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях V181, K265 и E185. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях V181, I383 и E186. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях K265, I383 и E185. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях L6, V181, K265 и

содержать мутацию V181I, мутацию K265A, мутацию I383V и мутацию E185D. В некоторых вариантах осуществления вариант фактора IX является по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 99% идентичным SEQ ID NO: 700, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, 100% или более активности по сравнению с фактором IX дикого типа. В некоторых вариантах осуществления вариант фактора IX является по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 99% идентичным SEQ ID NO: 700, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, 100% или более активности по сравнению с фактором IX дикого типа, и содержит мутацию V181I, мутацию K265A, мутацию I383V и/или мутацию E185D. В другом конкретном примере белок фактора IX может содержать мутацию L6F, мутацию V181I, мутацию K265A и мутацию I383V. В некоторых вариантах осуществления вариант фактора IX является по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 99% идентичным SEQ ID NO: 700, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, 100% или более активности по сравнению с фактором IX дикого типа, и содержит мутацию L6F, мутацию V181I, мутацию K265A и/или мутацию I383V.

Длина конструкции может варьироваться в зависимости от размера вставляемого гена и может составлять, например, от 200 пар оснований (п. о.) до около 5000 п. о., например, от около 200 п. о. до около 2000 п. о., например, от около 500 п. о. до около 1500 п. о. В некоторых вариантах осуществления длина донорной матрицы ДНК составляет около 200 п. о., или около 500 п. о., или около 800 п. о., или около 1000 пар оснований, или около 1500 пар оснований. В других вариантах осуществления длина донорной матрицы составляет по меньшей мере 200 п. о., или по меньшей мере 500 п. о., или по меньшей мере 800 п. о., или по меньшей мере 1000 п. о., или по меньшей мере 1500 п. о. В других вариантах осуществления длина донорной матрицы составляет по меньшей мере 200 п. о., или по меньшей мере 500 п. о., или по меньшей мере 800 п. о., или по меньшей мере 1000 п. о., или по меньшей мере 1500 п. о., или по меньшей мере 2000, или по меньшей мере 2500, или по меньшей мере 3000, или по меньшей мере 3500, или по меньшей мере 4000, или по меньшей мере 4500, или по меньшей мере 5000.

Конструкция может представлять собой ДНК или РНК, быть одноцепочечной, двухцепочечной или частично одно- и частично двухцепочечной, и может быть внесена в клетку-хозяин в линейной или кольцевой (например, мини-кольцевой) форме. Смотрите, например, патентные публикации США №№ 2010/0047805, 2011/0281361, 2011/0207221. При введении в линейной форме концы донорной последовательности можно защитить (например, от экзонуклеолитической деградации) способами, известными специалистам в данной области техники. Например, к 3' концу линейной молекулы добавляют один или более дидезоксинуклеотидных остатков и/или к одному или обоим концам лигируют самокомплементарные олигонуклеотиды. Смотрите, например, Chang et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4959-4963; Nehls et al. (1996) Science 272:886-889. Дополнительные способы защиты экзогенных полинуклеотидов от деградации включают, но не ограничиваются этим, добавление концевой(ых) аминокислоты (аминогрупп) и

использование модифицированных межнуклеотидных связей, таких как, например, тиофосфаты, фосфорамидаты и остатки О-метилрибозы или дезоксирибозы. Конструкцию можно вносить в клетку как часть векторной молекулы, имеющей дополнительные последовательности, такие как, например, точки начала репликации, промоторы и гены, кодирующие устойчивость к антибиотикам. В конструкции могут отсутствовать вирусные элементы. Более того, донорные конструкции можно вносить в виде оголенной нуклеиновой кислоты, в виде комплекса нуклеиновой кислоты с агентом, таким как липосома или полксамер, или можно доставлять с помощью вирусов (например, аденовируса, AAV, вируса герпеса, ретровируса, лентивируса).

В некоторых вариантах осуществления конструкция можно вставить так, чтобы ее экспрессия находилась под управлением эндогенного промотора в сайте вставки (например, эндогенного промотора альбумина, когда донор интегрирован в локус альбумина клетки-хозяина). В таких случаях в трансгене могут отсутствовать регуляторные элементы (например, промотор и/или энхансер), которые управляют его экспрессией (например, конструкция без промотора). Тем не менее, будет очевидно, что в других случаях конструкция может содержать промотор и/или энхансер, например конститутивный промотор или индуцибельный или тканеспецифический (например, специфический для печени или тромбоцитов) промотор, который управляет экспрессией функционального белка после интеграции. Конструкция может содержать последовательность, кодирующую гетерологичный белок фактора IX, расположенный ниже сигнальной последовательности, кодирующей сигнальный пептид, и функционально связанную с ней. В некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты работает при независимой от гомологии вставке нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок фактора IX. В некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты работает в неделящихся клетках, например, в клетках, в которых НГСК, а не ГР является основным механизмом, посредством которого происходит репарация двухцепочечных разрывов ДНК. Нуклеиновая кислота может представлять собой независимую от гомологии донорную конструкцию.

Некоторые донорные конструкции, содержащие гетерологичную нуклеиновую кислоту фактора IX (трансген фактора IX), подлежат вставке в участок надреза в целевой последовательности ДНК для системы редактирования генов (например, подлежат вставке в безопасный приемный ген, такой как локус альбумина) посредством негомологичного соединения концов. В некоторых случаях такие конструкции не содержат плечи гомологии. Например, такие конструкции можно вставлять в двухцепочечный разрыв с тупым концом после расщепления системой редактирования генов (например, системой CRISPR/Cas), как описано в данном документе. В конкретном примере конструкцию можно доставлять посредством AAV и она может подлежать вставке посредством негомологичного соединения концов (например, конструкция может быть такой, которая не содержит плечи гомологии).

В конкретном примере конструкцию можно вставлять посредством независимой от

гомологии целевой интеграции. Например, гетерологичная нуклеиновая кислота фактора IX в конструкции может фланкироваться с каждой стороны целевым сайтом для системы редактирования генов (например, тем же целевым сайтом, что и в целевой последовательности ДНК для нацеленной вставки (например, в безопасный приемный ген), и той же система редактирования генов, которая используется для расщепления целевой последовательности ДНК для нацеленной вставки). Затем система редактирования генов может расщеплять целевые сайты, фланкирующие гетерологичную нуклеиновую кислоту фактора IX. В конкретном примере конструкцию доставляют посредством AAV-опосредованной доставки, а расщепление целевых сайтов, фланкирующих гетерологичную нуклеиновую кислоту фактора IX, может удалять инвертированные концевые повторы (ИКП) AAV. В некоторых способах целевая последовательность ДНК для нацеленной вставки (например, последовательность целевой ДНК в безопасном приемном локусе, например, целевая последовательность гРНК, включая фланкирующий мотив, прилегающий к протоспейсеру) более не присутствует, если гетерологичная нуклеиновая кислота фактора IX вставлена в участок надреза или целевую последовательность ДНК в правильной ориентации, или же происходит ее перегруппировка, если гетерологичная нуклеиновая кислота фактора IX вставлена в сайт надреза или целевую последовательность ДНК в противоположной ориентации. Это может помочь гарантировать, что гетерологичная нуклеиновая кислота фактора IX вставлена в правильной ориентации для экспрессии.

В данном документе также описаны двунаправленные конструкции нуклеиновых кислот, которые обеспечивают улучшенную вставку и экспрессию гена фактора IX. Вкратце, различные описанные в данном документе двунаправленные конструкции содержат по меньшей мере два сегмента нуклеиновой кислоты, при этом один сегмент (первый сегмент) содержит кодирующую последовательность, кодирующую фактор IX (иногда взаимозаменяемо называемую в данном документе «трансгеном»), а другой сегмент (второй сегмент) содержит последовательность, в которой комплементарная последовательность кодирует фактор IX.

В одном варианте осуществления двунаправленные конструкции содержат по меньшей мере два сегмента нуклеиновой кислоты в *цис*-ориентации, при этом один сегмент (первый сегмент) содержит кодирующую последовательность (иногда взаимозаменяемо называемую в данном документе «трансгеном»), а другой сегмент (второй сегмент) содержит последовательность, в которой комплементарная последовательность кодирует фактор IX. Первый трансген и второй трансген могут быть одинаковыми или разными. Двунаправленные конструкции могут содержать по меньшей мере два сегмента нуклеиновой кислоты в *цис*-ориентации, причем один сегмент (первый сегмент) содержит кодирующую последовательность, которая кодирует гетерологичный ген в одной ориентации, тогда как другой сегмент (второй сегмент) содержит последовательность, в которой его комплементарная последовательность кодирует гетерологичный ген в другой ориентации. Это означает, что первый сегмент является

комплементарным ко второму сегменту (не обязательно идеально комплементарным); комплементарная последовательность второго сегмента является обратной комплементарной последовательностью первого сегмента (не обязательно идеальной обратной комплементарной последовательностью, хотя обе кодируют один и тот же гетерологичный белок). Двухнаправленная конструкция может содержать первую кодирующую последовательность, которая кодирует гетерологичный ген, связанный с акцептором сплайсинга, и вторую кодирующую последовательность, в которой комплементарная последовательность кодирует гетерологичный ген в другой ориентации, также связанный с акцептором сплайсинга.

При использовании в сочетании с системой редактирования генов (например, системой CRISPR/Cas; системой цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN); системой эффекторной нуклеазы, подобной активатору транскрипции (TALEN)), описанной в данном документе, двухнаправленность конструкций нуклеиновых кислот позволяет осуществлять вставку конструкции в любом направлении (не ограничивается вставкой в одном направлении) в целевой сайт вставки, обеспечивая экспрессию фактора IX из а) кодирующей последовательности одного сегмента (например, левого сегмента, кодирующего «F9 человека», верхняя левая конструкция ssAAV на Фиг. 1) или б) комплементарной последовательности другого сегмента (например, комплементарной последовательности правого сегмента, кодирующей «F9 человека», как проиллюстрировано в перевернутом виде в верхней левой конструкции ssAAV на Фиг. 1), тем самым улучшая вставку и экспрессию, как проиллюстрировано в данном документе. При практической реализации настоящего изобретения можно использовать различные известные системы редактирования генов, включая, например, систему CRISPR/Cas; систему цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN); систему эффекторной нуклеазы, подобной активатору транскрипции (TALEN).

Описанные в данном документе двухнаправленные конструкции могут быть модифицированы для включения любого подходящего структурного элемента, необходимого для любого конкретного применения и/или который обеспечивает одну или более необходимых функций. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты не содержит плечи гомологии. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты представляет собой независимую от гомологии донорную конструкцию. В некоторых вариантах осуществления, частично благодаря двухнаправленной функции конструкции нуклеиновой кислоты, двухнаправленную конструкцию можно вставлять в геномный локус в любом направлении, как описано в данном документе, чтобы обеспечить эффективную вставку и/или экспрессию представляющего интерес полипептида (например, фактора IX).

В некоторых вариантах осуществления двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты не содержит промотор, который управляет экспрессией фактора IX. Например, экспрессия фактора IX находится под управлением промотора клетки-хозяина (например,

промотора эндогенного альбумина, когда трансген интегрирован в локус альбумина клетки-хозяина).

В некоторых вариантах осуществления двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты содержит первый сегмент, содержащий кодирующую последовательность для фактора IX, и второй сегмент, содержащий обратную комплементарную последовательность кодирующей последовательности фактора IX. Таким образом, кодирующая последовательность в первом сегменте способна экспрессировать фактор IX, в то время как комплементарная последовательность обратной комплементарной последовательности во втором сегменте также способна экспрессировать фактор IX. В контексте данного документа термин «кодирующая последовательность» при описании второго сегмента, содержащего обратную комплементарную последовательность, относится к комплементарной (кодирующей) цепи второго сегмента (т. е. комплементарной кодирующей последовательности обратной комплементарной последовательности во втором сегменте).

В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность, которая кодирует фактор IX в первом сегменте, является менее чем на 100% комплементарной обратной комплементарной последовательности кодирующей последовательности, которая также кодирует фактор IX. Это означает, что в некоторых вариантах осуществления первый сегмент содержит кодирующую последовательность (1) для фактора IX, а второй сегмент является обратной комплементарной последовательностью кодирующей последовательности (2) для фактора IX, причем кодирующая последовательность (1) не идентична с кодирующей последовательностью (2). Например, кодирующая последовательность (1) и/или кодирующая последовательность (2), которая кодирует фактор IX, может являться кодон-оптимизированной так, что кодирующая последовательность (1) и обратная комплементарная последовательность кодирующей последовательности (2) обладают менее 100% комплементарности. В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность второго сегмента кодирует фактор IX с использованием одного или более альтернативных кодонов для одной или более аминокислот того же самого (т. е. с одинаковой аминокислотной последовательностью) фактора IX, кодируемого кодирующей последовательностью в первом сегменте. В контексте данного документа термин «альтернативный кодон» относится к вариациям в частоте использования кодонов для заданной аминокислоты и может быть или не быть предпочтительным или оптимизированным кодоном (кодон-оптимизированным) для заданной экспрессионной системы. Предпочтительное использование кодонов или кодоны, которые наиболее допустимы в заданной экспрессионной системе, известны в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления второй сегмент содержит обратную комплементарную последовательность, для которой характерно использование кодонов, отличное от кодирующей последовательности первого сегмента, чтобы снизить вероятность образования шпильки. Такая обратная комплементарная последовательность

спаривается по основаниям не со всеми нуклеотидами кодирующей последовательности в первом сегменте, но, необязательно, она кодирует тот же самый полипептид. В таких случаях кодирующая последовательность, например, для полипептида А, первого сегмента может быть гомологичной, но не идентичной кодирующей последовательности, например, для полипептида А, второй половины двунаправленной конструкции. В некоторых вариантах осуществления второй сегмент содержит обратную комплементарную последовательность, которая не является по существу комплементарной (например, не более чем на 70% комплементарной) кодирующей последовательности в первом сегменте. В некоторых вариантах осуществления второй сегмент содержит обратную комплементарную последовательность, которая не является существенно комплементарной (например, по меньшей мере на 90% комплементарной) кодирующей последовательности в первом сегменте. В некоторых вариантах осуществления второй сегмент содержит обратную комплементарную последовательность, имеющую по меньшей мере около 30%, около 35%, около 40%, около 45%, около 50%, около 55%, около 60%, около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 97% или около 99% комплементарности с кодирующей последовательностью в первом сегменте.

В некоторых вариантах осуществления второй сегмент содержит обратную комплементарную последовательность, имеющую 100% комплементарности с кодирующей последовательностью в первом сегменте. Это означает, что последовательность второго сегмента является идеальной обратной комплементарной последовательностью кодирующей последовательности в первом сегменте. В качестве примера первый сегмент содержит гипотетическую последовательность 5' CTGGACCGA 3' (SEQ ID NO: 500), а второй сегмент содержит обратную комплементарную последовательность SEQ ID NO: 1 - т. е. 5' TCGGTCCAG 3' (SEQ ID NO: 502).

В некоторых вариантах осуществления двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты содержит первый сегмент, содержащий кодирующую последовательность для фактора IX (первый полипептид), и второй сегмент, содержащий обратную комплементарную последовательность кодирующей последовательности (второго) полипептида. В некоторых вариантах осуществления каждый из первого и второго сегментов содержит кодирующую последовательность, которая кодирует тот же самый полипептид (например, фактор IX), как описано выше. В некоторых вариантах осуществления каждый из первого и второго сегментов содержит кодирующую последовательность, которая кодирует разные полипептиды. Например, первый полипептид представляет собой фактор IX, а второй полипептид представляет собой полипептид В. В качестве дополнительного примера первый полипептид представляет собой фактор IX, а второй полипептид представляет собой вариант (например, фрагмент, мутант, слияние) фактора IX (например, имеющий мутацию R338L, описанную в данном документе). Кодирующая последовательность, которая кодирует полипептид, может, необязательно, содержать одну или более дополнительных последовательностей, таких

как последовательности, кодирующие аминокислотные последовательности, такие как сигнальная последовательность, последовательность метки (например, HiBit) или гетерологичная функциональная последовательность (например, последовательность ядерной локализации (ПЯЛ) или саморасщепляющийся пептид), связанные с полипептидом. Кодирующая последовательность, которая кодирует полипептид, может, необязательно, содержать последовательности, кодирующие одну или более аминокислотных сигнальных пептидных последовательностей. Каждая из этих дополнительных последовательностей может быть одинаковой или разной в первом и втором сегментах конструкции.

В некоторых вариантах осуществления двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты является линейной. Например, первый и второй сегменты соединены линейным образом посредством линкерной последовательности. В некоторых вариантах осуществления 5' конец второго сегмента, который содержит обратную комплементарную последовательность, связан с 3' концом первого сегмента. В некоторых вариантах осуществления 5' конец первого сегмента связан с 3' концом второго сегмента, который содержит обратную комплементарную последовательность. В некоторых вариантах осуществления длина линкерной последовательности составляет около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 500, 1000, 1500, 2000 или более нуклеотидов. Как понятно специалистам в данной области техники, между первым и вторым сегментами могут быть вставлены другие структурные элементы в дополнение к линкерной последовательности или вместо нее.

Описанные в данном документе двунаправленные конструкции могут быть модифицированы для включения любого подходящего структурного элемента, необходимого для любого конкретного применения и/или который обеспечивает одну или более необходимых функций. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты не содержит плечи гомологии. В некоторых вариантах осуществления, частично благодаря двунаправленной функции конструкции нуклеиновой кислоты, двунаправленную конструкцию можно вставлять в геномный локус в любом направлении (ориентации), как описано в данном документе, чтобы обеспечить эффективную вставку и/или экспрессию представляющего интерес полипептида (например, гетерологичного фактора IX).

В некоторых вариантах осуществления один или оба из первого и второго сегментов содержат хвостовую последовательность полиаденилирования. Способы конструирования подходящей хвостовой последовательности полиаденилирования хорошо известны в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления один или оба из первого и второго сегментов содержат хвостовую последовательность полиаденилирования и/или сигнальную последовательность полиаденилирования ниже открытой рамки считывания. В некоторых вариантах осуществления хвостовая последовательность

полиаденилирования кодируется, например, в виде участка «поли-А» в 3' конце первого и/или второго сегмента. В некоторых вариантах осуществления хвостовую последовательность полиаденилирования обеспечивают котранскрипционно как результат сигнальной последовательности полиаденилирования, которая кодируется в 3' конце первого и/или второго сегмента или вблизи него. В некоторых вариантах осуществления поли-А-хвост содержит по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 оснований аденина, необязательно, до 300 оснований аденина. В некоторых вариантах осуществления поли-А-хвост содержит по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов аденина. Способы конструирования подходящей хвостовой последовательности полиаденилирования и/или сигнальной последовательности полиаденилирования хорошо известны в данной области техники. Подходящие акцепторные последовательности сплайсинга описаны и проиллюстрированы в данном документе, включая мышинный альбумин и человеческие акцепторные сайты FIX. В некоторых вариантах осуществления сигнальную последовательность полиаденилирования AAUAAA (SEQ ID NO: 800) обычно используют в системах млекопитающих, хотя были идентифицированы такие варианты, как UAUAAA (SEQ ID NO: 801) или AU/GUAAA (SEQ ID NO: 802). Смотрите, например, NJ Proudfoot, *Genes & Dev.* 25(17):1770-82, 2011. В некоторых вариантах осуществления включена хвостовая последовательность поли-А.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе конструкции могут представлять собой ДНК или РНК, быть одноцепочечными, двухцепочечными или частично одно- и частично двухцепочечными. Например, конструкции могут представлять собой одноцепочечную или двухцепочечную ДНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота может быть модифицирована (например, с использованием аналогов нуклеозидов), как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе конструкции содержат акцепторный сайт сплайсинга в одном или обоих концах конструкции, например, 5' относительно открытой рамки считывания в первом и/или втором сегментах, или 5' относительно последовательностей одного или обоих транскриптов. В некоторых вариантах осуществления акцепторный сайт сплайсинга содержит NAG. В дополнительных вариантах осуществления акцепторный сайт сплайсинга состоит из NAG. В некоторых вариантах осуществления акцептор сплайсинга представляет собой акцептор сплайсинга альбумина, например, акцептор сплайсинга альбумина, используемый при сплайсинге экзонов 1 и 2 альбумина. В некоторых вариантах осуществления акцептор сплайсинга получен из гена альбумина человека. В некоторых вариантах осуществления акцептор сплайсинга получен из гена альбумина мыши. В некоторых вариантах осуществления акцептор сплайсинга представляет собой акцептор сплайсинга F9 (или «FIX»), например, акцептор сплайсинга F9, используемый при сплайсинге экзонов 1 и 2 F9. В некоторых вариантах осуществления акцептор сплайсинга получен из гена F9 человека. В некоторых вариантах осуществления акцептор

сплайсинга получен из гена F9 мышцы. Дополнительные подходящие акцепторные сайты сплайсинга, используемые у эукариот, включая искусственные акцепторы сплайсинга, известны и могут быть получены из уровня техники. Смотрите, например, Shapiro, et al., 1987, *Nucleic Acids Res.*, 15, 7155-7174, Burset, et al., 2001, *Nucleic Acids Res.*, 29, 255-259.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе двунаправленные конструкции могут быть модифицированы в одном или обоих концах, чтобы включать, при необходимости, один или более подходящих структурных элементов и/или для обеспечения одного или более функциональных преимуществ. Например, структурные модификации могут варьироваться в зависимости от способа(ов), используемого(ых) для доставки описанных в данном документе конструкций в клетку-хозяина, например, доставки на основе вирусного вектора или упаковки в липидные наночастицы для доставки. Такие модификации включают, без ограничения, например, концевые структуры, такие как инвертированные концевые повторы (ИКП), шпильки, петли и другие структуры, такие как тороид. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе конструкции содержат один, два или три ИКП. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе конструкции содержат не более двух ИКП. В данной области техники известны различные способы структурных модификаций.

В некоторых вариантах осуществления оба конца донорной конструкции можно защитить (например, от экзонуклеолитической дегградации) способами, известными в данной области техники. Например, к 3' концу линейной молекулы добавляют один или более дидезоксинуклеотидных остатков и/или к одному или обоим концам лигируют самокомплементарные олигонуклеотиды. Смотрите, например, Chang et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4959-4963; Nehls et al. (1996) *Science* 272:886-889. Дополнительные способы защиты конструкций от дегградации включают, но не ограничиваются этим, добавление концевой(ых) аминогруппы (аминогрупп) и использование модифицированных межнуклеотидных связей, таких как, например, тиофосфаты, фосфорамидаты и остатки О-метилрибозы или дезоксирибозы.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе конструкции можно вносить в клетку как часть вектора, имеющего дополнительные последовательности, такие как, например, точки начала репликации, промоторы и гены, кодирующие устойчивость к антибиотикам. В некоторых вариантах осуществления конструкции можно вносить в виде оголенной нуклеиновой кислоты, в виде комплекса нуклеиновой кислоты с агентом, таким как липосома, полимер или полуксамер, или можно доставлять с помощью вирусных векторов (например, аденовируса, AAV, вируса герпеса, ретровируса, лентивируса).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, хотя это и не требуется для экспрессии, описанные в данном документе конструкции могут также содержать транскрипционные или трансляционные регуляторные последовательности, например, промоторы, энхансеры, инсуляторы, сайты внутренней посадки рибосомы,

последовательности, кодирующие пептиды, и/или сигналы полиаденилирования.

В некоторых вариантах осуществления конструкции, содержащие кодирующую последовательность для фактора IX, могут содержать одну или более из следующих модификаций: оптимизацию кодонов (например, в отношении кодонов человека) и/или добавление одного или более сайтов гликозилирования. Смотрите, например, McIntosh et al. (2013) *Blood* (17):3335-44.

D. Система редактирования генов

При практической реализации настоящего изобретения для нацеленной вставки гена фактора IX можно использовать различные известные системы редактирования генов, включая, например, систему CRISPR/Cas; систему цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN); систему эффекторной нуклеазы, подобной активатору транскрипции (TALEN). Как правило, системы редактирования генов включают использование сконструированных систем расщепления для индукции двухцепочечного разрыва (ДЦР) или ника (например, одноцепочечного разрыва или ОЦР) в целевой последовательности ДНК. Расщепление или создание одноцепочечного разрыва может происходить за счет применения специфических нуклеаз, таких как сконструированные ZFN, TALEN, или применения системы CRISPR/Cas со сконструированной гидовой РНК для управления специфическим расщеплением или созданием одноцепочечного разрыва в целевой последовательности ДНК. Кроме того, на основе системы Argonaute разрабатывают нацеленные нуклеазы (например, из *T. thermophilus*, известного как «TtAgo», смотрите Swarts et al (2014) *Nature* 507(7491): 258-261), которые также могут иметь потенциал для применения в редактировании генома и генной терапии.

Следует понимать, что в случае способов, в которых используют описанные в данном документе гидовые РНК, эти способы включают применение системы CRISPR/Cas (и любой из описанных в данном документе донорных конструкций, которые содержат последовательность, кодирующую фактор IX). Также следует принять во внимание, что настоящее изобретение предусматривает способы нацеленной вставки и экспрессии фактора IX с использованием двунаправленных конструкций, описанных в данном документе, которые можно осуществлять с или без гидовых РНК, описанных в данном документе (например, с использованием системы ZFN, чтобы обеспечить разрыв в целевой последовательности ДНК, создающий сайт для вставки двунаправленной конструкции).

В некоторых вариантах осуществления можно использоваться систему CRISPR/Cas (например, гидовая РНК и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент), чтобы создать сайт вставки в необходимом локусе в геноме хозяина, причем в этом сайте может быть вставлена донорная конструкция (например, двунаправленная конструкция), содержащая последовательность, кодирующую фактор IX, описанный в данном документе, для экспрессии фактора IX. Фактор IX может быть гетерологичным в отношении сайта или локуса вставки, например безопасного приемного локуса, из которого фактор IX обычно не экспрессируется, как описано в данном документе. В альтернативном варианте, в

некоторых вариантах осуществления фактор IX может быть негетерологичным в отношении сайта вставки, например, вставки фактора IX дикого типа в эндогенный локус для коррекции дефектного гена фактора IX. Безопасный приемный локус может находиться в гене альбумина, таком как ген альбумина человека. Безопасный приемный локус может находиться внутри области интрона 1 альбумина, например, интрона 1 альбумина человека. Безопасный приемный локус может представлять собой безопасный приемный локус человека, например, для ткани печени или гепатоцитной клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления описанную в данном документе гидовую РНК можно использовать в соответствии с представленными способами с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом (например, Cas-нуклеазой) для создания сайта вставки, в котором может быть вставлена донорная конструкция (например, двунаправленная конструкция), содержащая последовательность, кодирующую фактор IX, для экспрессии фактора IX. Гидовые РНК, применимые для нацеленной вставки фактора IX в интрон 1 локуса альбумина человека, проиллюстрированы и описаны в данном документе (смотрите, например, таблицу 1).

Способы использования различных РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов, например, нуклеазы, такой как Cas-нуклеаза, например, Cas9, также хорошо известны в данной области техники. Хотя использование двунаправленной нуклеиновой кислоты с системой CRISPR/Cas проиллюстрировано в данном документе, очевидно, что также можно использовать подходящие варианты этой системы. Следует понимать, что, в зависимости от контекста, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть предоставлен в виде нуклеиновой кислоты (например, ДНК или мРНК) или в виде белка. В некоторых вариантах осуществления представленный способ можно реализовать на практике в клетке-хозяине, которая уже содержит и/или экспрессирует РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas9-нуклеаза, обладает активностью кливазы, которую также можно назвать двухцепочечной эндонуклеазной активностью. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas9-нуклеаза, обладает активностью нуклеазы, которую также можно назвать одноцепочечной эндонуклеазной активностью. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит собой Cas-нуклеазу. Примеры Cas-нуклеаз включают системы CRISPR типа II *S. pyogenes*, *S. aureus* и других прокариот (смотрите, например, перечень в следующем параграфе), а также их варианты или мутантные (например, сконструированные, не встречающиеся в природе, встречающиеся в природе или другие варианты) версии. Смотрите, например, US2016/0312198 A1; US 2016/0312199 A1.

Неограничивающие типовые виды, из которых можно получать Cas-нуклеазу, включают *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Lactobacillus gasseri*, *Francisella novicida*, *Wolinella succinogenes*, *Sutterella wadsworthensis*, *Gamma proteobacterium*, *Neisseria meningitidis*,

Campylobacter jejuni, *Pasteurella multocida*, *Fibrobacter succinogene*, *Rhodospirillum rubrum*, *Nocardiosis dassonvillei*, *Streptomyces pristinaespiralis*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptosporangium roseum*, *Streptosporangium roseum*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Bacillus pseudomycooides*, *Bacillus selenitireducens*, *Exiguobacterium sibiricum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus buchneri*, *Treponema denticola*, *Microscilla marina*, *Burkholderiales bacterium*, *Polaromonas naphthalenivorans*, *Polaromonas sp.*, *Crocospaera watsonii*, *Cyanothece sp.*, *Microcystis aeruginosa*, *Synechococcus sp.*, *Acetohalobium arabaticum*, *Ammonifex degensii*, *Caldicelulosiruptor becscii*, *Candidatus Desulforudis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Finegoldia magna*, *Natranaerobius thermophilus*, *Pelotomaculum thermopropionicum*, *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Allochrochromatium vinosum*, *Marinobacter sp.*, *Nitrosococcus halophilus*, *Nitrosococcus watsoni*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Ktedonobacter racemifer*, *Methanohalobium evestigatum*, *Anabaena variabilis*, *Nodularia spumigena*, *Nostoc sp.*, *Arthrospira maxima*, *Arthrospira platensis*, *Arthrospira sp.*, *Lyngbya sp.*, *Microcoleus chthonoplastes*, *Oscillatoria sp.*, *Petrogona mobilis*, *Thermosiphon africanus*, *Streptococcus pasteurianus*, *Neisseria cinerea*, *Campylobacter lari*, *Parvibaculum lavamentivorans*, *Corynebacterium diphtheria*, *Acidaminococcus sp.*, бактерию *Lachnospiraceae ND2006* и *Acaaryochloris marina*.

В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой Cas9-нуклеазу из *Streptococcus pyogenes*. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой Cas9-нуклеазу из *Streptococcus thermophilus*. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой Cas9-нуклеазу из *Neisseria meningitidis*. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой Cas9-нуклеазу из *Staphylococcus aureus*. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой Cpf1-нуклеазу из *Francisella novicida*. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой Cpf1-нуклеазу из *Acidaminococcus sp.* В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой Cpf1-нуклеазу из бактерии *Lachnospiraceae ND2006*. В дополнительных вариантах осуществления изобретения Cas-нуклеаза представляет собой Cpf1-нуклеазу из *Francisella tularensis*, *Lachnospiraceae bacterium*, *Butyrivibrio proteoclasticus*, *Peregrinibacteria bacterium*, *Parcubacteria bacterium*, *Smithella*, *Acidaminococcus*, *Candidatus Methanoplasma termitum*, *Eubacterium eligens*, *Moraxella bovoculi*, *Leptospira inadai*, *Porphyromonas crevioricanis*, *Prevotella disiens* или *Porphyromonas macasaе*. В определенных вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой Cpf1-нуклеазу из *Acidaminococcus* или *Lachnospiraceae*.

В некоторых вариантах осуществления гРНК вместе с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом называется рибонуклеопротеиновым комплексом (РНП). В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas-нуклеазу. В некоторых вариантах осуществления гРНК вместе с Cas-нуклеазой называется Cas-РНП. В некоторых вариантах осуществления РНП содержит компоненты типа I, типа II или типа III. В некоторых вариантах осуществления

Cas-нуклеаза представляет собой белок Cas9 из системы CRISPR/Cas типа II. В некоторых вариантах осуществления гРНК вместе с Cas9 называется Cas9-РНК.

Cas9 дикого типа имеет два нуклеазных домена: RuvC и HNH. Домен RuvC расщепляет нецелевую цепь ДНК, а домен HNH расщепляет целевую цепь ДНК. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 содержит более одного домена RuvC и/или более одного домена HNH. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 представляет собой Cas9 дикого типа. В каждом из вариантов осуществления композиции, применения и способа Cas индуцирует двухцепочечный разрыв в целевой ДНК.

В некоторых вариантах осуществления используют химерные Cas-нуклеазы, в которых один домен или область белка заменены частью другого белка. В некоторых вариантах осуществления домен Cas-нуклеазы может быть заменен доменом другой нуклеазы, такой как FokI. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза может представлять собой модифицированную нуклеазу.

В других вариантах осуществления Cas-нуклеаза может быть получена из системы CRISPR/Cas типа I. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза может быть компонентом комплекса Cascade системы CRISPR/Cas типа I. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза может представлять собой белок Cas3. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза может быть получена из системы CRISPR/Cas типа III. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза может обладать активностью расщепления РНК.

В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент обладает одноцепочечной нуклеазной активностью, т. е. может надрезать одну цепь ДНК с образованием одноцепочечного разрыва, также известного как «ник». В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит собой Cas-никазу. Никаза представляет собой фермент, который создает ник в дцДНК, т. е. надрезает одну цепь двойной спирали ДНК, но не другую. В некоторых вариантах осуществления Cas-никаза представляет собой версию Cas-нуклеазы (например, Cas-нуклеазы, обсуждаемой выше), в которой эндонуклеолитический активный сайт инактивирован, например, за счет одного или более изменений (например, точечных мутаций) в каталитическом домене. Смотрите, например, патент США № 8889356 в отношении обсуждения Cas-никаза и типовых изменений каталитических доменов. В некоторых вариантах осуществления Cas-никаза, такая как Cas9-никаза, имеет инактивированный домен RuvC или HNH.

В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент модифицирован так, чтобы содержать только один функциональный нуклеазный домен. Например, белок агента может быть модифицирован так, чтобы один из доменов нуклеазы был мутирован или полностью или частично удален, чтобы снизить его активность расщепления нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления используют никазу, имеющую домен RuvC со сниженной активностью. В некоторых вариантах осуществления используют никазу, имеющую неактивный домен RuvC. В

некоторых вариантах осуществления используют никазу, имеющую домен HNH со сниженной активностью. В некоторых вариантах осуществления используют никазу, имеющую неактивный домен HNH.

В некоторых вариантах осуществления консервативная аминокислота в нуклеазном домене белка Cas заменена для снижения или изменения нуклеазной активности. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза может содержать аминокислотную замену в RuvC или RuvC-подобном нуклеазном домене. Примеры аминокислотных замен в RuvC или RuvC-подобном нуклеазном домене включают D10A (на основе белка Cas9 *S. pyogenes*). Смотрите, например, Zetsche et al. (2015) Cell Oct 22:163(3): 759-771. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза может содержать аминокислотную замену в HNH или HNH-подобном нуклеазном домене. Примеры аминокислотных замен в HNH или HNH-подобном нуклеазном домене включают E762A, H840A, N863A, H983A и D986A (на основе белка Cas9 *S. pyogenes*). Смотрите, например, Zetsche et al. (2015). Дополнительные типовые аминокислотные замены включают D917A, E1006A и D1255A (на основе последовательности *Francisella novicida* U112 Cpf1 (FnCpf1) (UniProtKB - A0Q7Q2 (CPF1_FRATN))).

В некоторых вариантах осуществления никаза предоставлена в комбинации с парой гидовых РНК, комплементарных смысловой и антисмысловой цепям целевой последовательности, соответственно. В этом варианте осуществления гидовые РНК направляют никазу к целевой последовательности и вносят ДЦР, создавая ники на противоположных цепях целевой последовательности (т. е. создание двойного ника). В некоторых вариантах осуществления никазу используют с двумя отдельными гидовыми РНК, нацеленными на противоположные цепи ДНК, для создания двойного ника в целевой ДНК. В некоторых вариантах осуществления никазу используют с двумя отдельными гидовыми РНК, выбранными так, чтобы находиться в непосредственной близости, для создания двойного ника в целевой ДНК.

В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит один или более гетерологичных функциональных доменов (например, представляет собой или содержит слитый полипептид).

В некоторых вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен может облегчить перенос РНК-направляемого ДНК-связывающего агента в ядро клетки. Например, гетерологичный функциональный домен может представлять собой сигнал ядерной локализации (СЯЛ). В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с 1-10 СЯЛ. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с 1-5 СЯЛ. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с одним СЯЛ. В случае применения одного СЯЛ, он может быть связан с N-концом или C-концом последовательности РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. Он также может быть вставлен в последовательность РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В других вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-

связывающий агент может быть слит с более чем одним СЯЛ. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с 2, 3, 4 или 5 СЯЛ. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с двумя СЯЛ. В определенных обстоятельствах два СЯЛ могут быть одинаковыми (например, два СЯЛ SV40) или разными. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент слит с двумя последовательностями СЯЛ SV40, присоединенными в карбокси-конце. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с двумя СЯЛ, одним, присоединенным в N-конце, и другим, присоединенным в C-конце. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с 3 СЯЛ. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, может не быть слит с СЯЛ. В некоторых вариантах осуществления СЯЛ может быть однокомпонентной последовательностью, такой как, например, СЯЛ SV40, РКККРКВ (SEQ ID NO: 600) или РКККРРВ (SEQ ID NO: 601). В некоторых вариантах осуществления СЯЛ может быть двухкомпонентной последовательностью, такой как СЯЛ нуклеоплазмина, КРРААТККАГQАКККК (SEQ ID NO: 602). В конкретном варианте осуществления одинарная РКККРКВ (SEQ ID NO: 600) СЯЛ может быть присоединена в C-конце РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В сайт слияния, необязательно, включены один или более линкеров.

Способы доставки

Описанные в данном документе гидовая РНК, РНК-направляемые ДНК-связывающие агенты (например, Cas-нуклеаза) и конструкции нуклеиновых кислот (например, двунаправленная конструкция) можно доставлять в клетку-хозяина, или популяцию клеток-хозяев, или организм субъекта *in vivo* или *ex vivo*, используя различные известные и подходящие способы, доступные в данной области техники. Гидовая РНК, РНК-направляемые ДНК-связывающие агенты и конструкции нуклеиновых кислот можно доставлять по отдельности или вместе в любой комбинации, используя одинаковые или разные способы доставки, в зависимости от ситуации.

Для внесения описанной в данном документе гидовой РНК, а также РНК-направляемого ДНК-связывающего агента и донорной конструкции в клетки (например, клетки млекопитающих) и целевые ткани можно использовать обычные способы доставки генов на вирусной и невирусной основе. В данном документе дополнительно предложены нуклеиновые кислоты систем доставки на основе невирусных векторов, таких как невирусные векторы, плазмидные векторы и, например, оголенная нуклеиновая кислота, и нуклеиновая кислота в комплексе с носителем для доставки, таким как липосома, липидная наночастица (ЛПЧ) или полуксамер. Системы доставки на основе вирусных векторов включают ДНК- и РНК-вирусы.

Способы и композиции для невирусной доставки нуклеиновых кислот включают электропорацию, липофекцию, микроинъекцию, биолистику, виросомы, липосомы, иммунолипосомы, ЛНЧ, конъюгаты нуклеиновых кислот с поликатионами или липидами,

оголенную нуклеиновую кислоту (например, оголенную ДНК/РНК), искусственные вирионы и усиленное агентом поглощение ДНК. Также для доставки нуклеиновых кислот можно использовать обработку ультразвуком, например, с помощью системы Sonitron 2000 system (Rich-Mar).

Дополнительные типовые системы для доставки нуклеиновых кислот включают предоставляемые AmaxaBiosystems (Cologne, Germany), Maxcyte, Inc. (Rockville, Md.), BTK Molecular Delivery Systems (Holliston, Ma.) и Copernicus Therapeutics Inc., (смотрите, например, патент США № 6008336). Липофекция описана, например, в патентах США №№ 5049386; 4946787; и 4897355), а реагенты для липофекции продаются на коммерческой основе (например, Transfectam™ и Lipofectin™). Получение комплексов липид:нуклеиновая кислота, включая нацеленные липосомы, такие как иммунолипидные комплексы, хорошо известно в данной области техники и описано в данном документе.

Различные системы доставки (например, векторы, липосомы, ЛНЧ), содержащие геновые РНК, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент и донорную конструкцию, отдельно или в комбинации, также можно вводить в организм для доставки в клетки *in vivo* или вводить в клетку или клеточную культуру *ex vivo*. Введение осуществляют любым из способов, обычно используемых для итогового приведения молекулы в контакт с кровью, жидкостью или клетками, включая, но не ограничиваясь этим, инъекцию, инфузию, местное нанесение и электропорацию. Подходящие способы введения таких нуклеиновых кислот доступны и хорошо известны специалистам в данной области техники.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены ДНК- или РНК-векторы, кодирующие любую из описанных в данном документе композиций, например, геновую РНК, содержащую любую одну или более их описанных в данном документе направляющих последовательностей; или конструкция (например, двунаправленная конструкция), содержащая последовательность, кодирующую фактор IX. В некоторых вариантах осуществления вектор также содержит последовательность, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В определенных вариантах осуществления изобретение включает ДНК- или РНК-векторы, кодирующие любую одну или более из описанных в данном документе композиций или в любой комбинации. В некоторых вариантах осуществления векторы дополнительно содержат, например, промоторы, энхансеры и регуляторные последовательности. В некоторых вариантах осуществления вектор, который содержит двунаправленную конструкцию, содержащую последовательность, кодирующую фактор IX, не содержит промотор, который управляет экспрессией фактора IX. Например, экспрессия полипептида фактора IX находится под управлением промотора клетки-хозяина (например, промотора эндогенного альбумина, когда трансген интегрирован в локус альбумина клетки-хозяина). В некоторых вариантах осуществления двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты содержит первый сегмент и второй сегмент, каждый из которых имеет акцептор сплайсинга, расположенный выше трансгена. В некоторых вариантах осуществления акцептор

сплайсинга совместим с донорной последовательностью сплайсинга безопасного приемного сайта клетки-хозяина, например, с донором сплайсинга интрона 1 гена альбумина человека. В некоторых вариантах осуществления вектор, который содержит гидовую РНК, содержащую любую одну или более из описанных в данном документе направляющих последовательностей, также содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих сгРНК, тРНК или сгРНК и тРНК, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую описанную в данном документе гидовую РНК. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит одну копию гидовой РНК. В других вариантах осуществления вектор содержит более одной копии гидовой РНК. В вариантах осуществления с более чем одной гидовой РНК гидовые РНК могут быть неидентичными в том смысле, что они нацелены на разные целевые последовательности, или могут быть идентичными в том смысле, что они нацелены на одну и ту же целевую последовательность. В некоторых вариантах осуществления, в которых векторы содержат более одной гидовой РНК, каждая гидовая РНК может обладать другими отличными свойствами, такими как активность или стабильность в комплексе с РНК-направляемой ДНК-нуклеазой, например, комплексе РНП Cas. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая гидовую РНК, может быть функционально связана по меньшей мере с одной транскрипционной или трансляционной регуляторной последовательностью, такой как промотор, 3' НТО или 5' НТО. В одном варианте осуществления промотор может представлять собой промотор тРНК, например, тРНК^{Lys3} или химерой тРНК. Смотрите Mefferd et al., RNA. 2015 21:1683-9; Scherer et al., Nucleic Acids Res. 2007 35: 2620-2628. В некоторых вариантах осуществления промотор может распознаваться РНК-полимеразой III (Pol III). Неограничивающие примеры промоторов Pol III включают промоторы U6 и H1. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая гидовую РНК, может быть функционально связана с промотором U6 мыши или человека. В других вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая гидовую РНК, может быть функционально связана с промотором H1 мыши или человека. В вариантах осуществления с более чем одной гидовой РНК промоторы, используемые для управления экспрессией, могут быть одинаковыми или разными. В некоторых вариантах осуществления нуклеотид, кодирующий сгРНК гидовой РНК, и нуклеотид, кодирующий тРНК гидовой РНК, могут находиться в одном векторе. В некоторых вариантах осуществления нуклеотид, кодирующий сгРНК, и нуклеотид, кодирующий тРНК, могут находиться под управлением одного промотора. В некоторых вариантах осуществления сгРНК и тРНК могут транскрибироваться в один транскрипт. Например, сгРНК и тРНК могут процессироваться из одного транскрипта с образованием гидовой РНК из двух молекул. В альтернативном варианте сгРНК и тРНК могут транскрибироваться в гидовую РНК из одной молекулы (огРНК). В других вариантах осуществления сгРНК и тРНК

могут находиться под управлением соответствующих промоторов в одном векторе. В других вариантах осуществления сгРНК и трРНК могут кодироваться разными векторами.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая гидовую РНК, может быть расположена в том же векторе, который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как белок Cas. В некоторых вариантах осуществления экспрессия гидовой РНК и РНК-направляемого ДНК-связывающего агента, такого как белок Cas, может находиться под управлением их собственных соответствующих промоторов. В некоторых экспрессия гидовой РНК может находиться под управлением того же промотора, который управляет экспрессией РНК-направляемого ДНК-связывающего агента, такого как белок Cas. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК и транскрипт РНК-направляемого ДНК-связывающего агента, такого как белок Cas, могут содержаться в рамках одного транскрипта. Например, гидовая РНК может находиться в нетранслируемой области (НТО) РНК-направляемого ДНК-связывающего агента, такого как транскрипт белка Cas. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК может находиться в 5' НТО транскрипта. В других вариантах осуществления гидовая РНК может находиться в 3' НТО транскрипта. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный период полужизни транскрипта может быть уменьшен за счет содержания гидовой РНК в 3' НТО и, таким образом, сокращения длины 3' НТО. В дополнительных вариантах осуществления гидовая РНК может находиться в интроне транскрипта. В некоторых вариантах осуществления подходящие сайты сплайсинга можно добавлять к интрону, в котором расположена гидовая РНК, чтобы обеспечить правильный сплайсинг гидовой РНК из транскрипта. В некоторых вариантах осуществления экспрессия РНК-направляемого ДНК-связывающего агента, такого как белок Cas, и гидовой РНК из одного вектора в непосредственной временной близости, может способствовать более эффективному образованию комплекса CRISPR RNP.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая гидовую РНК и/или РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, может быть расположена в том же векторе, который содержит конструкцию, содержащую ген фактора IX. В некоторых вариантах осуществления близость конструкции, содержащей ген фактора IX, и гидовой РНК (и/или РНК-направляемого ДНК-связывающего агента) в одном векторе может способствовать более эффективной вставке конструкции в сайт вставки, созданный гидовой РНК/РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих огРНК и мРНК, кодирующие РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, который может представлять собой белок Cas, такой как Cas9 или Cpf1. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих сгРНК, трРНК и мРНК, кодирующие РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, который может представлять собой белок Cas, такой как Cas9 или Cpf1. В одном варианте осуществления Cas9 получен

из *Streptococcus pyogenes* (т. е. Cas9 Spy). В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая crRNA, trRNA или crRNA и trRNA (которая может представлять собой ogRNA), содержит или состоит из направляющей последовательности, фланкируемой всей или частью повторяющейся последовательности из CRISPR/Cas природного происхождения. Нуклеиновая кислота, содержащая crRNA, trRNA или crRNA и trRNA или состоящая из них, может дополнительно содержать векторную последовательность, причем векторная последовательность содержит или состоит из нуклеиновых кислот, которые в природе не встречаются вместе с crRNA, trRNA или crRNA и trRNA.

В некоторых вариантах осуществления crRNA и trRNA кодируются не непрерывными нуклеиновыми кислотами в одном векторе. В других вариантах осуществления crRNA и trRNA могут кодироваться непрерывной нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления crRNA и trRNA кодируются противоположными цепями одной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления crRNA и trRNA кодируются одной цепью одной нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит донорную конструкцию (например, двунаправленную конструкцию нуклеиновой кислоты), содержащую последовательность, кодирующую фактор IX, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления, в дополнение к описанной в данном документе донорной конструкции (например, двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты) вектор может дополнительно содержать нуклеиновые кислоты, которые кодируют описанные в данном документе гидовые РНК, и/или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент (например, Cas-нуклеазу, такую как Cas9). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, находится в ином векторе, чем, который содержит описанную в данном документе донорную конструкцию (например, двунаправленную конструкцию). В любом из вариантов осуществления вектор может содержать другие последовательности, которые включают, но не ограничиваются этим, промоторы, энхансеры, регуляторные последовательности, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления промотор не управляет экспрессией фактора IX донорной конструкции (например, двунаправленной конструкции). В некоторых вариантах осуществления вектор содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих crRNA, trRNA или crRNA и trRNA. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих ogRNA и mRNA, кодирующие РНК-направляемую ДНК-нуклеазу, которая может представлять собой Cas-нуклеазу (например, Cas9). В некоторых вариантах осуществления вектор содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих crRNA, trRNA и mRNA, кодирующие РНК-направляемую ДНК-нуклеазу, которая может представлять собой Cas-нуклеазу, такую как Cas9. В некоторых вариантах осуществления Cas9 получен из *Streptococcus pyogenes* (т. е.

Cas9 Spy). В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая crRNA, trRNA или crRNA и trRNA (которая может представлять собой ogRNA), содержит или состоит из направляющей последовательности, фланкируемой всей или частью повторяющейся последовательности из CRISPR/Cas природного происхождения. Нуклеиновая кислота, содержащая crRNA, trRNA или crRNA и trRNA или состоящая из них, может дополнительно содержать векторную последовательность, причем векторная последовательность содержит или состоит из нуклеиновых кислот, которые в природе не встречаются вместе с crRNA, trRNA или crRNA и trRNA.

В некоторых вариантах осуществления вектор может быть кольцевым. В других вариантах осуществления вектор может быть линейным. В некоторых вариантах осуществления вектор может быть заключен в липидную наночастицу, липосому, нелипидную наночастицу или вирусный капсид. Неограничивающие типовые векторы включают плазмиды, фагмиды, космиды, искусственные хромосомы, минихромосомы, транспозоны, вирусные векторы и экспрессионные векторы.

В некоторых вариантах осуществления вектор может представлять собой вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор может быть генетически модифицирован по сравнению с его аналогом дикого типа. Например, вирусный вектор может содержать вставку, делецию или замену одного или более нуклеотидов для облегчения клонирования или для изменения одного или более свойств вектора. Такие свойства могут включать паковую способность, эффективность трансдукции, иммуногенность, интеграцию в геном, репликацию, транскрипцию и трансляцию. В некоторых вариантах осуществления часть вирусного генома может быть удалена, чтобы вирус был способен упаковать экзогенные последовательности большего размера. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор может иметь повышенную эффективность трансдукции. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ, индуцированный вирусом у хозяина, может быть снижен. В некоторых вариантах осуществления вирусные гены (такие как, например, интегразы), которые способствуют интеграции вирусной последовательности в геном хозяина, могут быть мутированы так, чтобы вирус становится неинтегрирующимся. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор может быть дефективным по репликации. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор может содержать экзогенные последовательности управления транскрипцией или трансляцией для управления экспрессией кодирующих последовательностей в векторе. В некоторых вариантах осуществления вирус может быть хелпер-зависимым. Например, вирусу могут быть необходимы один или более хелперных вирусов для доставки вирусных компонентов (таких как, например, вирусные белки), необходимых для амплификации и упаковки векторов в вирусные частицы. В таком случае в клетку-хозяина или популяцию клеток-хозяев вместе с описанной в данном документе векторной системой можно вносить один или более хелперных компонентов, включая один или более векторов, кодирующих вирусные компоненты. В других вариантах осуществления вирус может быть хелпер-независимым. Например, вирус

может быть способен амплифицировать и паковать векторы без хелперного вируса. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе векторная система может также кодировать вирусные компоненты, необходимые для амплификации и упаковки вируса.

Неограничивающие типовые вирусные векторы включают вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), лентивирусные векторы, аденовирусные векторы, хелпер-зависимые аденовирусные векторы (HDAd), векторы на основе вируса простого герпеса (HSV-1), бактериофаг T4, бакуловирусные векторы и ретровирусные векторы. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор может представлять собой AAV-вектор. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор может представлять собой лентивирусный вектор.

В некоторых вариантах осуществления «AAV» относится ко всем серотипам, подтипам и встречающимся в природе AAV, а также к рекомбинантному AAV. Аббревиатуру «AAV» можно использовать для обозначения самого вируса или его производного. Термин «AAV» включает AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAVrh.64R1, AAVhu.37, AAVrh.8, AAVrh.32.33, AAV8, AAV9, AAV-DJ, AAV2/8, AAVrh10, AAVLK03, AV10, AAV11, AAV12, rh10 и их гибриды, AAV птиц, AAV бычьих, AAV собачьих, AAV лошадиных, AAV приматов, AAV отличных от приматов животных и AAV овечьих. Геномные последовательности различных серотипов AAV, а также последовательности нативных концевых повторов (КП), Rep-белков и субъединиц капсида известны в данной области техники. Такие последовательности можно найти в литературе или в общедоступных базах данных, таких как GenBank. В контексте данного документа термин «AAV-вектор» относится к AAV-вектору, содержащему гетерологичную последовательность с происхождением, отличным от AAV (т. е. последовательность нуклеиновой кислоты, гетерологичную для AAV), обычно содержащую последовательность, кодирующую представляющий интерес гетерологичный полипептид. Конструкция может содержать капсидную последовательность AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAVrh.64R1, AAVhu.37, AAVrh.8, AAVrh.32.33, AAV8, AAV9, AAV-DJ, AAV2/8, AAVrh10, AAVLK03, AV10, AAV11, AAV12, rh10 и их гибридов, AAV птиц, AAV бычьих, AAV собачьих, AAV лошадиных, AAV приматов, AAV отличных от приматов животных и AAV овечьих. В общем случае последовательность гетерологичной нуклеиновой кислоты (трансен) фланкируется по меньшей мере одной и обычно двумя последовательностями инвертированных концевых повторов AAV (ИКП). AAV-вектор может быть одноцепочечным (ssAAV) или самокомплементарным (scAAV).

В некоторых вариантах осуществления лентивирус может быть неинтегрирующимся. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор может представлять собой аденовирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления аденовирус может представлять собой аденовирус с высокой клонирующей способностью или аденовирус «без внутренностей», в котором удалены все кодирующие вирусные

области, кроме 5' и 3' инвертированных концевых повторов (ИКП) и сигнала упаковки (Г), чтобы увеличить его пакующую способность. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор может представлять собой вектор HSV-1. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе HSV-1 является хелпер-зависимым, а в других вариантах он является хелпер-независимым. Например, для ампликонного вектора, в котором сохранена только последовательность упаковки, необходим хелперный вирус со структурными компонентами для упаковки, тогда как для вектора HSV-1 с удалением 30 т. п. о., что устраняет второстепенные вирусные функции, нет необходимости в хелперном вирусе. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор может представлять собой бактериофаг T4. В некоторых вариантах осуществления бактериофаг T4 может быть способен упаковывать любые линейные или кольцевые молекулы ДНК или РНК при опустошении головки вируса. В дополнительных вариантах осуществления вирусный вектор может представлять собой бакуловирусный вектор. В дополнительных вариантах осуществления вирусный вектор может представлять собой ретровирусный вектор. В вариантах осуществления с использованием AAV или лентивирусных векторов, которые обладают меньшей клонирующей способностью, может быть необходимо использовать более одного вектора для доставки всех компонентов векторной системы, как описано в данном документе. Например, один AAV-вектор может содержать последовательности, кодирующие РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как белок Cas (например, Cas9), тогда как второй AAV-вектор может содержать одну или более направляющих последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления векторная система может быть способна управлять экспрессией одного или более компонентов нуклеазы в клетке. В некоторых вариантах осуществления двунаправленная конструкция, необязательно как часть векторной системы, может содержать промотор, способный управлять экспрессией кодирующей последовательности в клетке. В некоторых вариантах осуществления вектор не содержит промотор, который управляет экспрессией одной или более кодирующих последовательностей после интеграции в клетку (например, использует эндогенный промотор клетки-хозяина, например, как при вставке в интрон 1 локуса альбумина, как проиллюстрировано в данном документе). В некоторых вариантах осуществления клетка может быть эукариотической клеткой, такой как, например, клетка дрожжей, растений, насекомых или млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления эукариотическая клетка может представлять собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления эукариотическая клетка может представлять собой клетку грызуна. В некоторых вариантах осуществления эукариотическая клетка может представлять собой клетку человека. Подходящие промоторы для управления экспрессией в разных типах клеток известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления промотор может быть дикого типа. В других вариантах осуществления промотор может быть модифицирован для более эффективной или действенной экспрессии. В других вариантах осуществления промотор может быть усечен, но при этом сохранять свою

функцию. Например, промотор может иметь нормальный или уменьшенный размер, который подходит для надлежащей упаковки вектора в вирус.

В некоторых вариантах осуществления вектор может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую описанный в данном документе РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как белок Cas (например, Cas9). В некоторых вариантах осуществления нуклеаза, кодируемая вектором, может представлять собой белок Cas. В некоторых вариантах осуществления векторная система может содержать одну копию нуклеотидной последовательности, кодирующей нуклеазу. В других вариантах осуществления векторная система может содержать более одной копии нуклеотидной последовательности, кодирующей нуклеазу. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая нуклеазу, может быть функционально связана по меньшей мере с одной транскрипционной или трансляционной регуляторной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая нуклеазу, может быть функционально связана по меньшей мере с одним промотором.

В некоторых вариантах осуществления вектор может содержать любую одну или более конструкций, содержащих описанный в данном документе гетерологичный ген фактора IX. В некоторых вариантах осуществления ген фактора IX может быть функционально связан по меньшей мере с одной транскрипционной или трансляционной регуляторной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления ген фактора IX может быть функционально связан по меньшей мере с одним промотором. В некоторых вариантах осуществления ген фактора IX не связан с промотором, который управляет экспрессией гетерологичного гена.

В некоторых вариантах осуществления промотор может быть конститутивным, индуцибельным или тканеспецифическим. В некоторых вариантах осуществления промотор может представлять собой конститутивный промотор. Неограничивающие типовые конститутивные промоторы включают немедленно ранний промотор цитомегаловируса (CMV), промотор вируса обезьян (SV40), главный поздний промотор аденовируса (MLP), промотор вируса саркомы Рауса (RSV), промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), промотор фосфоглицераткиназы (PGK), промотор фактора элонгации-альфа (EF1a), промоторы убиквитина, промоторы актина, промоторы тубулина, промоторы иммуноглобулина, их функциональный фрагмент или комбинацию любых из вышеперечисленных промоторов. В некоторых вариантах осуществления промотор может представлять собой промотор CMV. В некоторых вариантах осуществления промотор может представлять собой усеченный промотор CMV. В других вариантах осуществления промотор может представлять собой промотор EF1a. В некоторых вариантах осуществления промотор может представлять собой индуцибельный промотор. Неограничивающие типовые индуцибельные промоторы включают те, которые индуцируются тепловым шоком, светом, химическими веществами, пептидами, металлами, стероидами, антибиотиками или спиртом. В некоторых вариантах

осуществления индуцибельный промотор может представлять собой промотор, который имеет низкий базовый (неиндуцированный) уровень экспрессии, такой как, например, промотор Tet-On[®] (Clontech).

В некоторых вариантах осуществления промотор может представлять собой тканеспецифический промотор, например, промотор, специфический в отношении экспрессии в печени.

В некоторых вариантах осуществления композиции содержат векторную систему. В некоторых вариантах осуществления векторная система может содержать один вектор. В других вариантах осуществления векторная система может содержать два вектора. В дополнительных вариантах осуществления векторная система может содержать три вектора. Когда для мультиплексирования используют разные гидовые РНК или когда используют несколько копий гидовой РНК, векторная система может содержать более трех векторов.

В некоторых вариантах осуществления векторная система может содержать индуцибельные промоторы, чтобы экспрессия начиналась только после ее доставки в целевую клетку. Неограничивающие типовые индуцибельные промоторы включают те, которые индуцируются тепловым шоком, светом, химическими веществами, пептидами, металлами, стероидами, антибиотиками или спиртом. В некоторых вариантах осуществления индуцибельный промотор может представлять собой промотор, который имеет низкий базовый (неиндуцированный) уровень экспрессии, такой как, например, промотор Tet-On[®] (Clontech).

В дополнительных вариантах осуществления векторная система может содержать тканеспецифические промоторы, чтобы экспрессия начиналась только после ее доставки в конкретную ткань.

Вектор, содержащий гидовую РНК, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или донорную конструкцию, содержащую последовательность, кодирующую фактор IX, по отдельности или в любой комбинации, может быть доставлен с помощью липосомы, наночастицы, экзосомы или микровезикулы. Вектор также может быть доставлен с помощью липидных наночастиц (ЛНЧ). Одна или более гидовых РНК, РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов (например, мРНК) или донорных конструкций, содержащих последовательность, кодирующую гетерологичный белок, по отдельности или в любой комбинации, могут быть доставлены с помощью липосомы, наночастицы, экзосомы или микровезикулы. Одна или более гидовых РНК, РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов (например, мРНК) или донорных конструкций, содержащих последовательность, кодирующую гетерологичный белок, по отдельности или в любой комбинации, могут быть доставлены с помощью ЛНЧ.

Липидные наночастицы (ЛНЧ) являются хорошо известным средством доставки нуклеотидного и белкового груза и могут использоваться для доставки любых из гидовых РНК, РНК-направляемого ДНК-связывающего агента и/или донорной конструкции (например, двунаправленной конструкции), описанных в данном документе. В некоторых

вариантах осуществления ЛНЧ доставляют композиции в форме нуклеиновой кислоты (например, ДНК или мРНК), или белка (например, Cas-нуклеазы), или нуклеиновой кислоты вместе с белком, в зависимости от ситуации.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ доставки любой из описанных в данном документе гидовых РНК и/или описанной в данном документе донорной конструкции (например, двунаправленной конструкции), отдельно или в комбинации, в клетку-хозяина или популяцию клеток-хозяев или в организм субъекта, причем любые один или более компонентов связаны с ЛНЧ. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает применение РНК-направляемого ДНК-связывающего агента (например, Cas9 или последовательности, кодирующей Cas9).

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена композиция, содержащая любую из описанных в данном документе гидовых РНК и/или описанную в данном документе донорную конструкцию (например, двунаправленную конструкцию), отдельно или в комбинации с ЛНЧ. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент (например, Cas9 или последовательность, кодирующую Cas9).

В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержат катионные липиды. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержат (9Z,12Z)-3-(((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил)октадека-9,12-диеноат, также называемый 3-(((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил(9Z,12Z) -октадека-9,12-диеноатом), или другой ионизируемый липид. Смотрите, например, липиды из PCT/US2018/053559 (поданной 28 сентября, 2018 г.), WO/2017/173054, WO2015/095340 и WO2014/136086, а также ссылки, приведенные в них. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ имеют молярное отношение катионного липидного амина к фосфату РНК (N:P) около 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 или 6,5. В некоторых вариантах осуществления термины «катионный» и «ионизируемый» в контексте ЛНЧ-липидов являются взаимозаменяемыми, например, когда ионизируемые липиды являются катионными в зависимости от pH.

В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ, связанные с двунаправленной конструкцией, описанной в данном документе, используют при изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания или нарушения. Заболевание или нарушение может представлять собой дефицит фактора IX, такой как гемофилия В.

В некоторых вариантах осуществления любые из описанных в данном документе гидовых РНК, РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов и/или описанную в данном документе донорную конструкцию (например, двунаправленную конструкцию), отдельно или в комбинации, оголенные или как часть вектора, составляют или вводят с помощью липидной наночастицы; смотрите, например, WO/2017/173054, содержание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления включена композиция ЛНЧ, содержащая компонент РНК и липидный компонент, причем липидный компонент включает аминный липид, такой как биоразлагаемый ионизируемый липид. В некоторых случаях липидный компонент включает биоразлагаемый ионизируемый липид, холестерин, ДСФХ и ПЭГ-ДМГ.

Будет очевидно, что описанные в данном документе гидовая РНК, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент (например, Cas-нуклеаза или нуклеиновая кислота, кодирующая Cas-нуклеазу) и донорная конструкция (например, двунаправленная конструкция), содержащая последовательность, кодирующую фактор IX, могут быть доставлены с использованием одной или разных систем. Например, гидовую РНК, Cas-нуклеазу и конструкцию может нести один вектор (например, AAV). В альтернативном варианте Cas-нуклеазу (в виде белка или мРНК) и/или гРНК могут нести плазида или ЛНЧ, тогда как донорную конструкцию может нести вектор, такой как AAV. Кроме того, разные системы доставки можно вводить одним и тем же или разными путями (например, путем инфузии; путем инъекции, например, внутримышечной инъекции, инъекции в хвостовую вену или другой внутривенной инъекции; путем внутривентрикулярного введения и/или внутримышечной инъекции).

Разные системы доставки можно доставлять *in vitro* или *in vivo* одновременно или в любом последовательном порядке. В некоторых вариантах осуществления донорную конструкцию, гидовую РНК и Cas-нуклеазу можно доставлять *in vitro* или *in vivo* одновременно, например, в одном векторе, двух векторах, отдельных векторах, одной ЛНЧ, двух ЛНЧ, отдельных ЛНЧ или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления донорную конструкцию можно доставлять *in vivo* или *in vitro* в виде вектора и/или связанной с ЛНЧ до (например, за около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более суток) доставки гидовой РНК и/или Cas-нуклеазы в виде вектора и/или связанных с ЛНЧ, по отдельности или вместе в виде рибонуклеопротеина (РНП). В качестве дополнительного примера, гидовую РНК и Cas-нуклеазу в виде вектора и/или связанных с ЛНЧ, по отдельности или вместе в виде рибонуклеопротеина (РНП), можно доставлять *in vivo* или *in vitro* до (например, за около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более суток) доставки конструкции в виде вектора и/или связанной с ЛНЧ.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении также предложены фармацевтические составы для введения любой из описанных в данном документе гидовых РНК. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент (например, Cas-нуклеазу), и донорную конструкцию, содержащую кодирующую последовательность терапевтического гетерологичного гена, как описано в данном документе. Фармацевтические составы, подходящие для доставки субъекту (например, человеку), хорошо известны в данной области техники.

Способы применения

Описанные в данном документе гРНК, донорная конструкция (например,

двунаправленная конструкция, содержащая последовательность, кодирующую фактор IX) и РНК-направляемые ДНК-связывающие агенты, применимы для введения нуклеиновой кислоты фактора IX в клетку-хозяина или популяцию клеток-хозяев *in vivo* или *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гРНК, донорная конструкция (например, двунаправленная конструкция, содержащая последовательность, кодирующую фактор IX) и РНК-направляемые ДНК-связывающие агенты, применимы для экспрессии фактора IX в клетке-хозяине или популяции клеток-хозяев, или в организме нуждающегося в этом субъекта. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гРНК, донорная конструкция (например, двунаправленная конструкция, содержащая последовательность, кодирующую фактор IX) и РНК-направляемые ДНК-связывающие агенты, применимы для лечения гемофилии, (например, гемофилии В) у нуждающегося в этом субъекта. Введение любых описанных в данном документе одной или более гРНК, донорной конструкции (например, двунаправленной конструкции, содержащей последовательность, кодирующую фактор IX), и РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов будет повышать уровни белка фактора IX и/или уровни активности фактора IX, например, циркулирующие, сывороточные или плазменные уровни. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения можно оценить путем измерения сывороточной или плазменной активности фактора IX, причем повышение плазменного уровня и/или активности фактора IX у субъекта указывает на эффективность лечения. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения можно оценить путем измерения сывороточных или плазменных уровней белка фактора IX и/или активности, причем повышение плазменных уровня и/или активности фактора IX у субъекта указывает на эффективность лечения. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения можно определить посредством оценки функции свертывания в анализе АЧТВ и/или образования тромбина в анализе TGA-EA. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения можно определить посредством оценки уровня фактора IX, например, циркулирующего фактора IX, измеряемого с помощью анализа коагуляции и/или иммунологического анализа, например, сэндвич-иммуноанализа, ELISA (смотрите, например, пример 13), MSD (смотрите, например, пример 14).

У нормальных или здоровых индивидов активность фактора IX и уровни антигена варьируются от около 50 до 160% от нормальной объединенной плазмы, что составляет около 3-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ с учетом очистки из плазмы взрослого человека Amiral et al., Clin. Chem. 30(9), 1512-16, 1984 в таблице 2; также смотрите Osterud et al., 1978. Индивидов, имеющих менее 50% нормального плазменного уровня активности фактора IX и/или уровни антигена, классифицируют как страдающих гемофилией. В частности, индивидов с менее чем около 1% активного фактора классифицируют как имеющих тяжелую гемофилию, тогда как индивиды с около 1-5% активного фактора имеют умеренную гемофилию. У индивидов с легкой формой гемофилии уровень активного фактора свертывания крови составляет от 6 до 49% от нормального. В некоторых вариантах осуществления уровень

циркулирующего фактора IX можно измерить с помощью анализа коагуляции и/или иммунологического анализа, которые хорошо известны в данной области техники (например, Simioni et al, NEJM 2009, Adcock et al., Coagulation Handbook, Esoterix Laboratory Services, 2006). Иммунологический метод обнаружения белка hFIX и способ функциональной нормализации активности фактора IX гиперфункционального варианта hFIX можно найти в примере 13. В некоторых вариантах осуществления фактор IX, например, циркулирующий фактор IX, можно измерить с помощью анализа коагуляции и/или иммунологического анализа, например, сэндвич-иммуноанализа, ELISA (смотрите, например, пример 13), MSD (смотрите, например, пример 14).

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе композиции и способы применимы для повышения плазменных уровней фактора IX или активности фактора IX у субъекта, имеющего гемофилию, до около 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50% или более от нормального уровня.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе композиции и способы применимы для повышения активности и/или уровней фактора IX, например описанные в данном документе композиции и способы применимы уровней циркулирующего белка FIX до около 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 3 или 4 $\mu\text{г/мл}$. Уровни белка FIX могут достигать около 150 $\mu\text{г/мл}$ или более. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе композиции и способы применимы для повышения уровня белка фактора IX до около 4 $\mu\text{г/мл}$. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе композиции и способы применимы для повышения уровней белка фактора IX от около 4 $\mu\text{г/мл}$ до около 5 $\mu\text{г/мл}$, от около 4 $\mu\text{г/мл}$ до 6 $\mu\text{г/мл}$, от около 4 $\mu\text{г/мл}$ до 8 $\mu\text{г/мл}$, от около 4 $\mu\text{г/мл}$ до около 10 $\mu\text{г/мл}$ или более. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе композиции и способы применимы для повышения уровней белка фактора IX от около 0,1 $\mu\text{г/мл}$ до около 10 $\mu\text{г/мл}$, от около 1 $\mu\text{г/мл}$ до около 10 $\mu\text{г/мл}$, от около 0,1 $\mu\text{г/мл}$ до около 6 $\mu\text{г/мл}$, от около 1 $\mu\text{г/мл}$ до около 6 $\mu\text{г/мл}$, от около 2 $\mu\text{г/мл}$ до около 5 $\mu\text{г/мл}$ или от около 3 $\mu\text{г/мл}$ до около 5 $\mu\text{г/мл}$. Например, описанные в данном документе композиции и способы применимы для повышения плазменных уровней фактора IX у субъекта, имеющего гемофилию, до около 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150 $\mu\text{мкг/мл}$ или более.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе композиции и способы применимы для повышения плазменных уровней фактора IX и/или активности у субъекта, имеющего гемофилию, на около 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%,

42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200% или более по сравнению с плазменным уровнем и/или активностью фактора IX до введения.

В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе композиции и способы применимы для повышения количества белка фактора IX и/или активности фактора IX в клетке-хозяине или популяции клеток-хозяев на около 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200% или более по сравнению с уровнем и/или активностью фактора IX до введения в клетку-хозяина или популяцию клеток-хозяев, например, нормальным уровнем. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку печени или популяцию клеток печени. В некоторых вариантах осуществления клетка печени представляет собой гепатоцит или популяция клеток печени представляет собой гепатоциты.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение гидовой РНК и РНК-направляемого ДНК-связывающего агента (такого как мРНК, кодирующая Cas9-нуклеазу) в ЛНЧ. В дополнительных вариантах осуществления способ включает введение конструкции нуклеиновой кислоты AAV, кодирующей белок фактора IX, такой как двунаправленная конструкция FIX. CRISPR/Cas9 ЛНЧ, содержащую гидовую РНК и мРНК, кодирующую Cas9, можно вводить внутривенно. Донорную конструкцию AAV FIX можно вводить внутривенно. Типовое дозирование CRISPR/Cas9 ЛНЧ включает около 0,1, 0,25, 0,3, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 или 10 мг/кг (РНК). Единицы мг/кг и миллиграммы на килограмм взаимозаменяемо используют в данном документе. Типовое дозирование AAV, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую белок FIX, включает МЗ около 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} и 10^{14} вг/кг, необязательно МЗ может составлять от около 1×10^{13} до 1×10^{14} вг/кг.

В некоторых вариантах осуществления способ включает экспрессию терапевтически эффективного количества белка фактора IX. В некоторых вариантах осуществления способ включает достижение терапевтически эффективного уровня коагуляционной активности циркулирующего фактора IX у индивида. В конкретных вариантах осуществления способ включает достижение активности фактора IX от по меньшей мере около 5% до около 50% от нормы. Способ может включать достижение активности фактора IX от по меньшей мере около 50% до около 150% от нормы. В некоторых вариантах осуществления способ включает достижение повышения активности фактора IX по сравнению с исходной активностью фактора IX у пациента, составляющего по меньшей мере от около 1% до около 50% от нормальной активности фактора IX, или от по меньшей мере около 5% до около 50% от нормальной активности фактора IX, или от по меньшей мере около 50% до около 150% от нормальной активности фактора IX.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает достижение продолжительного эффекта, длящегося, например, по меньшей мере 1 месяц, 2 месяца, 6 месяцев, 1 год или 2 года. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает достижение продолжительного и устойчивого терапевтического эффекта, длящегося, например, по меньшей мере 1 месяц, 2 месяца, 6 месяцев, 1 год или 2 года. В некоторых вариантах осуществления уровень активности и/или уровень циркулирующего фактора IX является стабильным в течение по меньшей мере 1 месяца, 2 месяцев, 6 месяцев, 1 года или более. В некоторых вариантах осуществления достижение стабильной активности и/или уровня белка FIX происходит по меньшей мере через 7 суток, по меньшей мере 14 суток или по меньшей мере 28 суток. В дополнительных вариантах осуществления способ включает поддержание активности и/или уровней фактора IX после одной дозы в течение по меньшей мере 1, 2, 4 или 6 месяцев или по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 лет.

В дополнительных вариантах осуществления, включающих вставку в локус альбумина, уровни циркулирующего альбумина у индивида являются нормальными. Способ может включать поддержание уровней циркулирующего альбумина у индивида в пределах $\pm 5\%$, $\pm 10\%$, $\pm 15\%$, $\pm 20\%$ или $\pm 50\%$ от нормальных уровней циркулирующего альбумина. В некоторых вариантах осуществления уровни альбумина у индивида остаются неизменными по сравнению с уровнями альбумина у индивидов, не получающих лечения, по меньшей мере на 4 неделе, 8 неделе, 12 неделе или 20 неделе. В некоторых вариантах осуществления уровни альбумина индивида временно падают, а затем возвращаются к нормальным уровням. В частности, способы могут включать обнаружение отсутствия значительных изменений плазменных уровней альбумина.

В некоторых вариантах осуществления изобретение включает способ или применение модификации (например, создания двухцепочечного разрыва) гена альбумина, такого как ген альбумина человека, включающие введение или доставку в клетку-хозяина или популяцию клеток-хозяев любых описанных в данном документе одной или более гРНК, донорной конструкции (например, двунаправленной конструкции, содержащей последовательность, кодирующую фактор IX) и РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов (например, Cas-нуклеазы). В некоторых вариантах осуществления изобретение включает способ или применение модификации (например, создания двухцепочечного разрыва) области интрона 1 альбумина, такого как интрон 1 альбумина человека, включающие введение или доставку в клетку-хозяина или популяцию клеток-хозяев любых описанных в данном документе одной или более гРНК, донорной конструкции (например, двунаправленной конструкции, содержащей последовательность, кодирующую фактор IX) и РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов (например, Cas-нуклеазы). В некоторых вариантах осуществления изобретение включает способ или применение модификации (например, создания двухцепочечного разрыва) безопасного приемного локуса человека, такого как ткань печени или гепатоцитарная клетка-хозяин, включающие введение или доставку в клетку-хозяина или популяцию клеток-хозяев

любых описанных в данном документе одной или более гРНК, донорной конструкции (например, двунаправленной конструкции, содержащей последовательность, кодирующую фактор IX) и РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов (например, Cas-нуклеазы). Вставка в безопасный приемный локус, такой как локус альбумина, позволяет обеспечивать сверхэкспрессию гена фактора IX без существенного вредного воздействия на клетку-хозяина или популяцию клеток, таких как гепатоциты или клетки печени. В некоторых вариантах осуществления изобретение включает способ или применение модификации (например, создания двухцепочечного разрыва) интрона 1 локуса альбумина человека, включающие введение или доставку в клетку-хозяина или популяцию клеток-хозяев любых описанных в данном документе одной или более гРНК, донорной конструкции (например, двунаправленной конструкции, содержащей последовательность, кодирующую фактор IX) и РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов (например, Cas-нуклеазы). В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит направляющую последовательность, которая содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов, которые связываются в пределах интрона 1 локуса альбумина человека (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, содержащую по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 и 97. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, которая составляет по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-97. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов

последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5, 10-17, 21-27 и 29-33. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5, 10-17, 21-27 и 29-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5, 10-17, 21-27 и 29-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, содержащую по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5, 10-17, 21-27 и 29-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-37, 42-49, 53-59, 61-69, 74-81, 85-91 и 93-97. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5, 10-17, 21-27 и 29-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, которая составляет по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5, 10-17, 21-27 и 29-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-37, 42-49, 53-59, 61-69, 74-81, 85-91 и 93-97. В некоторых вариантах осуществления способ осуществляют *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления способ осуществляют *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления донорная конструкция представляет собой двунаправленную конструкцию, которая содержит последовательность, кодирующую фактор IX. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку печени, такую как. В дополнительных вариантах осуществления клетка печени представляет собой гепатоцит.

В некоторых вариантах осуществления изобретение включает способ или применение внесения нуклеиновой кислоты фактора IX в клетку-хозяина или популяцию клеток-хозяев, включающие введение или доставку описанных в данном документе одной или более гРНК, донорной конструкции (например, двунаправленной конструкции, содержащей последовательность, кодирующую фактор IX) и РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов (например, Cas-нуклеазы). В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит направляющую последовательность, которая содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов, которые способны связываться с областью в пределах интрона I локуса альбумина человека (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы,

состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, содержащую по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 и 97. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, которая составляет по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-97. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5, 10-17, 21-27 и 29-33. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5, 10-17, 21-27 и 29-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5, 10-17, 21-27 и 29-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, содержащую по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5, 10-17, 21-27 и 29-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-37, 42-49, 53-59, 61-69, 74-81, 85-91 и 93-97. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5, 10-17, 21-27 и 29-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, которая составляет по меньшей мере

17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5, 10-17, 21-27 и 29-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-37, 42-49, 53-59, 61-69, 74-81, 85-91 и 93-97. В некоторых вариантах осуществления способ представляет собой способ *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления способ представляет собой способ *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления донорная конструкция представляет собой двунаправленную конструкцию, которая содержит последовательность, кодирующую фактор IX. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку печени или популяция клеток-хозяев представляет собой клетки печени, такие как гепатоциты.

В некоторых вариантах осуществления изобретение включает способ или применение экспрессии фактора IX в клетке-хозяине или популяции клеток-хозяев, включающие введение или доставку описанных в данном документе одной или более гРНК, донорной конструкции (например, двунаправленной конструкции, содержащей последовательность, кодирующую фактор IX) и РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов (например, Cas-нуклеазы). В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит направляющую последовательность, которая содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов, которые способны связываться с областью в пределах интрона 1 локуса альбумина человека (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, содержащую по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 и 97. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, которая составляет по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ

ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-97. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5, 10-17, 21-27 и 29-33. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5, 10-17, 21-27 и 29-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5, 10-17, 21-27 и 29-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, содержащую по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5, 10-17, 21-27 и 29-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-37, 42-49, 53-59, 61-69, 74-81, 85-91 и 93-97. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5, 10-17, 21-27 и 29-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, которая составляет по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5, 10-17, 21-27 и 29-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-37, 42-49, 53-59, 61-69, 74-81, 85-91 и 93-97. В некоторых вариантах осуществления способ представляет собой способ *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления способ представляет собой способ *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления донорная конструкция представляет собой двунаправленную конструкцию, которая содержит последовательность, кодирующую фактор IX. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку печени или популяция клеток-хозяев представляет собой клетки печени, такие как гепатоциты.

В некоторых вариантах осуществления изобретение включает способ или применение лечения гемофилии (например, гемофилии В), включающие введение или доставку любых описанных в данном документе одной или более гРНК, донорной конструкции (например, двунаправленной конструкции, содержащей последовательность, кодирующую фактор IX) и РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов (например, Cas-нуклеазы) нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит направляющую последовательность, которая содержит по

меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов, которые способны связываться с областью в пределах интрона 1 локуса альбумина человека (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, содержащую по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 и 97. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, которая составляет по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-97. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5, 10-17, 21-27 и 29-33. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5, 10-17, 21-27 и 29-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5, 10-17, 21-27 и 29-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, содержащую по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5, 10-17, 21-27 и 29-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-37, 42-49, 53-59, 61-69, 74-81, 85-91 и 93-97. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую

последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5, 10-17, 21-27 и 29-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, которая составляет по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5, 10-17, 21-27 и 29-33. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гидовые РНК содержат направляющую последовательность, которая выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-37, 42-49, 53-59, 61-69, 74-81, 85-91 и 93-97. В некоторых вариантах осуществления донорная конструкция представляет собой двунаправленную конструкцию, которая содержит последовательность, кодирующую фактор IX. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку печени или популяция клеток-хозяев представляет собой клетки печени, такие как гепатоциты.

Как описано в данном документе, донорную конструкцию (например, двунаправленную конструкцию), содержащую последовательность, кодирующую фактор IX, гидовую РНК и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент можно доставлять с помощью любых подходящих системы доставки и способа, известных в данной области техники. Композиции можно доставлять *in vitro* или *in vivo*, одновременно или в любом последовательном порядке. В некоторых вариантах осуществления донорную конструкцию, гидовую РНК и Cas-нуклеазу можно доставлять *in vitro* или *in vivo* одновременно, например, в одном векторе, двух векторах, отдельных векторах, одной ЛНЧ, двух ЛНЧ, отдельных ЛНЧ или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления донорную конструкцию можно доставлять *in vivo* или *in vitro* в виде вектора и/или связанной с ЛНЧ до (например, за около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более суток) доставки гидовой РНК и/или Cas-нуклеазы в виде вектора и/или связанными с ЛНЧ, по отдельности или вместе в виде рибонуклеопротеина (РНП). В некоторых вариантах осуществления донорную конструкцию можно доставлять многократно, например, каждые сутки, каждые двое суток, каждые трое суток, каждые четверо суток, каждую неделю, каждые две недели, каждые три недели или каждые четыре недели. В некоторых вариантах осуществления донорную конструкцию можно доставлять с однонедельными интервалами, например, на 1 неделе, 2 неделе и 3 неделе и т. д. В качестве дополнительного примера, гидовую РНК и Cas-нуклеазу в виде вектора и/или связанные с ЛНЧ, по отдельности или вместе в виде рибонуклеопротеина (РНП), можно доставлять *in vivo* или *in vitro* до (например, за около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более суток) доставки конструкции в виде вектора и/или связанной с ЛНЧ. В некоторых вариантах осуществления гидовую РНК альбумина можно доставлять многократно, например, каждые сутки, каждые двое суток, каждые трое суток, каждые четверо суток, каждую неделю, каждые две недели, каждые три недели или каждые четыре недели. В некоторых вариантах осуществления гидовую РНК альбумина можно доставлять с однонедельными интервалами, например, на 1 неделе, 2 неделе и 3 неделе и

т. д. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеазу можно доставлять за несколько введений, например, можно доставлять каждые сутки, каждые двое суток, каждые трое суток, каждые четверо суток, каждую неделю, каждые две недели, каждые три недели или каждые четыре недели. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеазу можно доставлять с однонедельными интервалами, например, а 1 неделе, 2 неделе и 3 неделе и т. д. В некоторых вариантах осуществления гидовая РНК и Cas-нуклеаза связаны с ЛНЧ, и их доставляют в клетку-хозяина или популяцию клеток-хозяев до доставки донорной конструкции фактора IX.

В некоторых вариантах осуществления донорная конструкция содержит последовательность, кодирующую фактор IX, причем последовательность фактора IX представляет собой фактор IX дикого типа, например, SEQ ID NO: 700. В некоторых вариантах осуществления донорная конструкция содержит последовательность, кодирующую фактор IX, причем последовательность фактора IX представляет собой фактор IX дикого типа, например, SEQ ID NO: 701. В некоторых вариантах осуществления последовательность кодирует вариант фактора IX. Например, вариант обладает большей коагуляционной активностью, чем фактор IX дикого типа. Например, вариантный фактор IX содержит одну или более мутаций, таких как аминокислотная замена в позиции R338 (например, R338L), по сравнению с SEQ ID NO: 701. В некоторых вариантах осуществления последовательность кодирует вариант фактора IX, который является на 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 99% идентичным SEQ ID NO: 700, SEQ ID NO: 701 или SEQ ID NO: 702, имеющими по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, 100% или более активности по сравнению с фактором IX дикого типа. В некоторых вариантах осуществления последовательность кодирует фрагмент фактора IX, причем фрагмент обладает по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, 100% или более активности по сравнению с фактором IX дикого типа.

В одном примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях L6 и V181. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях L6 и K265. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях L6 и I383. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях L6 и E185. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях V181 и K265. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях V181 и I383. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях V181 и E185. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях K265 и I383. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях K265 и E185. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях I383 и E185. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях L6, V181 и K265. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях L6, V181 и I383. В другом примере белок

фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях L6, V181 и E185. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях L6, K265 и I383. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях L6, K265 и E185. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях L6, I383 и E186. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях V181, K265 и I383. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях V181, K265 и E185. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях V181, I383 и E186. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях K265, I383 и E185. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях L6, V181, K265 и I383. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях L6, V181, I383 и E185. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях L6, K265, I383 и E185. В другом примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях V181, K265, I383 и E185.

В некоторых вариантах осуществления донорная конструкция содержит последовательность, кодирующую вариант фактора IX, причем вариант фактора IX активирует коагуляцию в отсутствие своего кофактора, фактора VIII (экспрессия приводит к терапевтически релевантной имитирующей FVIII активности). Такие варианты фактора IX могут дополнительно поддерживать активность фактора IX дикого типа. Например, такой вариант фактора IX может содержать аминокислотную замену в позиции L6, V181, K265, I383, E185 или их комбинацию по сравнению с фактором IX дикого типа (например, по сравнению с SEQ ID NO: 701). Например, такой вариант фактора IX может содержать мутацию L6F, мутацию V181I, мутацию K265A, мутацию I383V, мутацию E185D или их комбинацию по сравнению с фактором IX дикого типа (например, по сравнению с SEQ ID NO: 701).

В конкретном примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях V181, K265 и I383. В другом конкретном примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях V181, K265, I383 и E185. В другом конкретном примере белок фактора IX может содержать аминокислотные замены в позициях L6, V181, K265 и I383.

В одном примере белок фактора IX может содержать мутацию L6F и мутацию V181I. В другом примере белок фактора IX может содержать мутацию L6F и мутацию K265A. В другом примере белок фактора IX может содержать мутацию L6F и мутацию I383V. В другом примере белок фактора IX может содержать мутацию L6F и мутацию E185D. В другом примере белок фактора IX может содержать мутацию V181I и мутацию K265A. В другом примере белок фактора IX может содержать мутацию V181I и мутацию I383V. В другом примере белок фактора IX может содержать мутацию V181I и мутацию E185D. В другом примере белок фактора IX может содержать мутацию K265A и мутацию

I383V. В другом примере белок фактора IX может содержать мутацию K265A и мутацию E185D. В другом примере белок фактора IX может содержать мутацию I383V и мутацию E185D. В другом примере белок фактора IX может содержать мутацию L6F, мутацию V181I и мутацию K265A. В другом примере белок фактора IX может содержать мутацию L6F, мутацию V181I и мутацию I383V. В другом примере белок фактора IX может содержать мутацию L6F, мутацию V181I и мутацию E185D. В другом примере белок фактора IX может содержать мутацию L6F, мутацию K265A и мутацию I383V. В другом примере белок фактора IX может содержать мутацию L6F, мутацию K265A и мутацию E185D. В другом примере белок фактора IX может содержать мутацию L6F, мутацию I383V и мутацию E186D. В другом примере белок фактора IX может содержать мутацию V181I, мутацию K265A и мутацию I383V. В другом примере белок фактора IX может содержать мутацию V181I, мутацию K265A и мутацию E185D. В другом примере белок фактора IX может содержать мутацию V181I, мутацию I383V и мутацию E186D. В другом примере белок фактора IX может содержать мутацию K265A, мутацию I383V и мутацию E185D. В другом примере белок фактора IX может содержать мутацию L6F, мутацию V181I, мутацию K265A и мутацию I383V. В другом примере белок фактора IX может содержать мутацию L6F, мутацию V181I, мутацию I383V и мутацию E185D. В другом примере белок фактора IX может содержать мутацию L6F, мутацию K265A, мутацию I383V и мутацию E185D. В другом примере белок фактора IX может содержать мутацию V181I, мутацию K265A, мутацию I383V и мутацию E185D.

В конкретном примере белок фактора IX может содержать мутацию V181I, мутацию K265A и мутацию I383V. В другом конкретном примере белок фактора IX может содержать мутацию V181I, мутацию K265A, мутацию I383V и мутацию E185D. В некоторых вариантах осуществления белок фактора IX является по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 99% идентичным SEQ ID NO: 700, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, 100% или более активности по сравнению с фактором IX дикого типа. В некоторых вариантах осуществления вариант фактора IX является по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 99% идентичным SEQ ID NO: 700, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, 100% или более активности по сравнению с фактором IX дикого типа, и содержит мутацию V181I, мутацию K265A, мутацию I383V и/или мутацию E185D. В другом конкретном примере белок фактора IX может содержать мутацию L6F, мутацию V181I, мутацию K265A и мутацию I383V. В некоторых вариантах осуществления вариант фактора IX является по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 99% идентичным SEQ ID NO: 700, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, 100% или более активности по сравнению с фактором IX дикого типа, и содержит мутацию V181I, мутацию K265A и мутацию I383V.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку печени или популяция клеток-хозяев представляет собой клетки печени. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой или популяция клеток-хозяев

представляет собой любые подходящие неделящиеся клетки. В контексте данного документа термин «неделяющаяся клетка» относится к клеткам, которые окончательно дифференцированы и не делятся, а также к покоящимся клеткам, которые не делятся, но сохраняют способность повторно начинать клеточное деление и пролиферацию. Клетки печени, например, сохраняют способность делиться (например, при повреждении или резекции), но, как правило, не делятся. При митотическом делении клеток гомологичная рекомбинация представляет собой механизм, посредством которого происходит защита генома и репарация двухцепочечных разрывов. В некоторых вариантах осуществления «неделяющаяся» клетка относится к клетке, в которой гомологичная рекомбинация (ГР) не является основным механизмом, посредством которого происходит репарация двухцепочечных разрывов ДНК в клетке, например, по сравнению с контрольной делящейся клеткой. В некоторых вариантах осуществления «неделяющаяся» клетка относится к клетке, в которой негомологичное соединение концов (НГСК) является основным механизмом, посредством которого происходит репарация двухцепочечных разрывов ДНК в клетке, например, по сравнению с контрольной делящейся клеткой. Неделящиеся типы клеток были описаны в литературе, например, в отношении активных механизмов НГСК для репарации двухцепочечных разрывов ДНК. Смотрите, например, Yuama, DNA Repair (Amst.) 2013, 12(8): 620-636. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин включает, но не ограничивается этим, клетку печени, мышечную клетку или нейрональную клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин или популяция клеток-хозяев представляют собой гепатоцит, такой как гепатоцит мыши, яванского макака или человека. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой миоцит, такой как миоцит мыши, яванского макака или человека. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена композиция клетки-хозяина, содержащая любую одну или более из описанных в данном документе гидовых РНК, отдельно или в комбинации с РНК-направляемым ДНК-связывающим белком. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена композиция клетки-хозяина, содержащая любой один или более из описанных в данном документе векторов.

В некоторых вариантах осуществления донорную конструкцию (например, двунаправленную конструкцию) вводят в векторе нуклеиновой кислоты, таком как AAV-вектор, например, AAV8. В некоторых вариантах осуществления донорная конструкция не содержит плечо гомологии.

В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее. В некоторых аспектах субъект представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления субъектом является корова, свинья, обезьяна, овца, собака, кошка, рыба или домашняя птица.

В некоторых вариантах осуществления донорную конструкцию (например, двунаправленную конструкцию), содержащую последовательность, кодирующую фактор IX, гидовую РНК и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления донорную конструкцию (например,

двунаправленную конструкцию), содержащую последовательность, кодирующую фактор IX, гидовую РНК и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент вводят в печеночную циркуляцию.

В некоторых вариантах осуществления одного введения донорной конструкции (например, двунаправленной конструкции), содержащей последовательность, кодирующую фактор IX, гидовой РНК и РНК-направляемого ДНК-связывающего агента достаточно для повышения экспрессии фактора IX до необходимого уровня. В других вариантах осуществления может быть необходимо более одного введения композиции, содержащей донорную конструкцию (например, двунаправленную конструкцию), содержащую последовательность, кодирующую фактор IX, гидовую РНК и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, для максимизации терапевтических эффектов.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает комбинированную терапию, включающую применение описанных в данной документе одной или более гРНК, донорной конструкции (например, двунаправленной конструкции, содержащей последовательность, кодирующую фактор IX) и РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов (например, Cas-нуклеазы) вместе с дополнительной терапией, подходящей для лечения гемофилии, как описано выше. Например, способы по настоящему изобретению можно комбинировать с применением других гемостатических агентов, факторов крови и лекарственных средств. Например, субъекту можно вводить терапевтически эффективное количество одного или более факторов, выбранных из группы, состоящей из фактора XI, фактора XII, прекалликреина, высокомолекулярного кининогена (ВМК), фактора V, фактора VII, фактора VIII, фактора X, фактора XIII, фактора II, фактора VIIa и фактора фон Виллебранда.

В некоторых вариантах осуществления лечение может дополнительно включать введение прокоагулянта, такого как активатор внутренней системы коагуляции, включая фактор Ха, фактор IXa, фактор XIa, фактор XIIa и VIIa, прекалликреин и высокомолекулярный кининоген; или активатора внешней системы коагуляции, включая тканевой фактор, фактор VIIa, фактор Va и фактор Ха. Это описание и типовые варианты осуществления не следует рассматривать как ограничивающие. В целях данного описания и прилагаемых вариантов осуществления, если не указано иное, все числа, выражающие количества, проценты или доли, и другие числовые значения, используемые в описании и вариантах осуществления, следует понимать как модифицируемые во всех случаях термином «около» при условии, что они еще не модифицированы таким образом. Соответственно, если не указано иное, числовые параметры, приведенные в нижеследующем описании и прилагаемых вариантах осуществления, являются приближениями, которые могут варьироваться в зависимости от необходимых свойств, которые должны быть получены. По меньшей мере и без попытки ограничить применение доктрины эквивалентов объемом формулы изобретения, каждый числовой параметр следует толковать по меньшей мере в контексте количества приведенных значимых цифр и с применением обычных методов округления.

Последовательность белка фактора IX человека (SEQ ID NO: 700) NCBI Ref: NP_000124:

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEF
VQGNL
ERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSKDDINS
YECWCP
FGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAV
PFPCGR
VSVSQTSKLTRAETVFPDVDYVNSTEAEITLDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKP
GQFPW
QVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHEQKR
NVIRII
PHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSG
WGRVF
HKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGGP
HVTEVE
GTSFLTGIISWGEECAMKGKYGITKVSRYVNWIKETKLT

Нуклеотидная последовательность фактора IX человека (SEQ ID NO: 706) NCBI Ref: NM_000133:

1 accacttca caatctgcta gcaaaggta tgcagcgcgt gaacatgac atggcagaat
61 caccaggcct caccaccatc tgccttttag gatatctact cagtgetgaa tgtacagttt
121 ttcttgatca tgaaaacgcc aacaaaatc tgaatcggcc aaagaggat aattcaggta
181 aattggaaga gttgttcaa gggaaccttg agagagaatg tatggaagaa aagtgtagtt
241 ttgaagaagc acgagaagtt ttgaaaaca ctgaaagaac aactgaattt tggaagcagt
301 atgttgatgg agatcagttg gagtccaatc catgtttaaa tggcggcagt tgcaaggatg
361 acattaatc ctatgaatgt tgggtgccct ttggattga aggaaagaac tgtgaattag
421 atgtaacatg taacattaag aatggcagat gcgagcagtt ttgtaaaaat agtctgata
481 acaagtggtt ttgctcctgt actgagggat atcgacttgc agaaaaccag aagtcctgtg
541 aaccagcagt gccattcca tgtggaagag ttctgtttc aaaaacttct aagtcacc
601 gtgctgagac tgttttct gatgtggact atgtaaatc Tactgaagct gaaaccattt
661 tggataacat cactcaaac accaatcat ttaatgactt cactcgggtt gttggtggag
721 aagatgcaa accaggtaa tcccttggc aggtgtttt gaatggtaa gttgatgat
781 tctgtggagg ctctatcgtt aatgaaaaat ggattgtaac tgctgccac tgtgttga
841 ctggtgttaa aattacagtt gtcgcaggtg aacataat ttaggagaca gaacatacag
901 agcaaaagc aatgtgatt cgaattatc ctcaccaca ctacaatgca gctattaata
961 agtacaacca tgacattgcc cttctggaac tggacgaacc cttagtcta aacagctacg
1021 ttacacat ttgcattgct gacaaggaat acacgaacat cttctcaaa ttggatctg
1081 gctatgtaag tggtgggga agagtctcc acaaggag atcagctta gttctcagt
1141 acctagagt tccactgtt gaccagcca catgtctcg atctacaag taccatct
1201 ataacaacat gttctgtgct ggcttccatg aaggagtag agattcatgt caaggagata

1261 gtgggggacc ccatgttact gaagtggaag ggaccagttt cttaactgga attattagct
 1321 ggggtgaaga gtgtgcaatg aaaggcaaat atggaatata taccaaggta tcccggtag
 1381 tcaactgat taaggaaaa acaaagctca cttaatgaaa gatggatttc caaggtaat
 1441 tcattggaat tgaaaattaa cagggcctct cactaactaa tcacttccc atctttgtt
 1501 agatttgaat atatacttc tatgatcatt gcttttctc ttacagggg agaatttcat
 1561 attttacctg agcaaattga ttgaaaaatg gaaccactag aggaatataa tegttagga
 1621 aattacagtc atttctaagg gcccagcct tgacaaaatt gtgaagttaa attctccact
 1681 ctgtccatca gatactatgg ttctcacta tggcaactaa ctactcaat ttccctct
 1741 tagcagcatt ccatctccc gatctcttt gcttctcaa ccaaacatc aatgtttatt
 1801 agttctgtat acagtacagg atctttgtcactctatca caaggccagt accacactca
 1861 tgaagaaga acacaggagt agctgagagg ctaaaactca tcaaaaacacactccttt
 1921 cctctacct attctcaat cttttacct ttccaaatcc caatcccaa atcagtttt
 1981 ctcttctta ctctctct ccttttacc ctccatggtc gttaaaggag agatggggg
 2041 catcattctg ttatactct gtacacagt atacatgct atcaaacca gacttcttc
 2101 cgtagtggag acttgcttt cagaacatag ggatgaagta aggtgcctga aaagttggg
 2161 ggaaaagttt ctttcagaga gtttaagttat ttatatata taatatata ataaaatata
 2221 taatatacaa tataaatata tagtgtgtgt gtatgcgtgt gtgtagacac acacgcatac
 2281 acacataaa tggaagcaat aagccattct aagagcttgt atggttatgg aggtctgact
 2341 agcatgatt tcacgaaggc aagattggca tatcattgta actaaaaaag ctgacattga
 2401 cccagacata ttgtactct tctaaaaata ataataataa tgctaacaga aagaagagaa
 2461 ccgttcgitt gcaatctaca gctagtagag actttgagga agaattcaac agtgtgtct
 2521 cagcagtgt cagagccaag caagaagttg aagttgccta gaccagagga cataagtac
 2581 atgtctctt taactagcat acccgaagt ggagaagggt gcagcaggct caaaggcata
 2641 agtcattcca atcagccaac taagttgtcc tttctggtt tegtgtcac catggaacat
 2701 tttgattata gttaatcct ctacttgaa tctctagag agttgctgac caactgacgt
 2761 atgttccct ttgtgaatta ataaactggg gttctggtc в

Полипептид фактора IX человека (SEQ ID NO: 701)

YNSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESN
 PCLNGGSKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVT CNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTE
 GYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQT SKLTRAETVFPDVDYVNSTEAEITLDNITQSTQ
 SFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITV
 VAGEHNIEETENTEQRNVIRIIPHHNYNA AINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAD
 KEYTNIFLKFSGYVSGWGRVFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCA
 GFHEGGRDSCQGDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSR YVNWIKE
 KTKLT

ПРИМЕРЫ

Нижеприведенные примеры представлены для иллюстрации определенных описанных вариантов осуществления и их не следует воспринимать как ограничивающие каким-либо образом объем данного изобретения.

Пример 1 - Материалы и методы

Клонирование и получение плазмиды

Двунаправленная вставочная конструкция, фланкируемая ИКП, была синтезирована и клонировали в pUC57-Kan коммерческим поставщиком. Полученную в результате конструкцию (P00147) использовали в качестве исходного клонирующего вектора для других векторов. Другие вставочные конструкции (без ИКП) также были коммерчески синтезированы и клонированы в pUC57. Очищенную плазмиду расщепляли рестрикционным ферментом BglII (New England BioLabs, кат. № R0144S), и клонировали вставочные конструкции в исходный вектор. Плазмиду размножали в химически компетентных *E. coli* Stb13™ (Thermo Fisher, кат. № C737303).

Получение AAV

Тройную трансфекцию клеток HEK293 использовали для упаковки геномов представляющими интерес конструкциями для получения AAV8 и AAV-DJ, а полученные в результате векторы очищали как из лизированных клеток, так и из культуральной среды методом ультрацентрифугирования в градиенте йодиксанола (смотрите, например, Lock et al., Hum Gene Ther. 2010 Oct;21(10):1259-71). Плазмиды, используемые в тройной трансфекции, которые содержали геном с представляющими интерес конструкциями, обозначены в примерах по номеру «PXXXX», также смотрите, например, таблицу 9. Выделенный AAV подвергали диализу в буфере для хранения (ФСБ с 0,001% плюроники F68). Титр AAV определяли с помощью кПЦР, используя праймеры/зонд, локализованные в области ИКП.

In vitro транскрипция («IVT») мРНК нуклеазы

Кэпированную и полиаденилированную мРНК *Cas9* *Streptococcus pyogenes* («Spy»), содержащую N1-метил псевдо-U, создавали посредством транскрипции *in vitro* транскрипции, используя линейаризованную плазмидную ДНК-матрицу и РНК-полимеразу T7. В общем случае плазмидную ДНК, содержащую промотор T7 и область поли-(A/T) из 100 нуклеотидов, линейаризовали путем инкубации при 37°C с XbaI для полного расщепления с последующей тепловой инактивацией XbaI при 65 °C. Линейаризованную плазмиду очищали от фермента и буферных солей. Реакцию IVT для создания модифицированной мРНК *Cas9* инкубировали при 37 °C в течение 4 часов в следующих условиях: 50 нг/мкл линейаризованной плазмиды; 2 mM каждого из ГТФ, АТФ, ЦТФ и N1-метил псевдо-UTP (Trilink); 10 mM ARCA (Trilink); 5 E/мкл РНК-полимеразы T7 (NEB); 1 E/мкл мышинового ингибитора РНКазы (NEB); 0,004 E/мкл неорганической пирофосфатазы *E. coli* (NEB); и 1x реакционного буфера. ДНКазу TURBO (ThermoFisher) добавляли до конечной концентрации 0,01 E/мкл и инкубировали реакцию еще в течение 30 минут, чтобы удалить ДНК-матрицу. мРНК *Cas9* очищали, используя набор для очистки MegaClear Transcription Clean-up в соответствии с протоколом производителя (ThermoFisher). В альтернативном варианте мРНК *Cas9* очищали, используя осаждение LiCl, осаждение ацетатом аммония и осаждение ацетатом натрия или используя метод осаждения LiCl с последующей очисткой путем фильтрации с тангенциальным потоком. Концентрацию транскрипта определяли путем измерения поглощения света на 260 нм

(Nanodrop), а транскрипт анализировали методом капиллярного электрофореза с помощью Bioanalyzer (Agilent).

Нижеприведенные мРНК Cas9 содержат OPC Cas9 SEQ ID NO: 703 или SEQ ID NO: 704 или последовательность из Таблицы 24 в PCT/US2019/053423 (которая включена в данный документ посредством ссылки).

Липидные составы для доставки мРНК Cas9 и гРНК

мРНК Cas9 и гРНК доставляли в клетки и организм животных, используя липидные составы, содержащие ионизируемый липид (9Z,12Z)-3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропилоктадека-9,12-диеноат, также называемый 3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил(9Z,12Z) -октадека-9,12-диеноатом), холестерин, ДСФХ и ПЭГ2т-ДМГ.

Для экспериментов с использованием предварительно смешанных липидных составов (называемых в данном документе «липидными пакетами») компоненты восстанавливали в 100% этаноле в молярном соотношении ионизируемый липид:холестерин:ДСФХ:ПЭГ2т-ДМГ 50:38:9:3 перед смешиванием с нагрузкой РНК (например, мРНК Cas9 и гРНК) в молярном соотношении липидного амина к РНК-фосфату (N:P) около 6,0, как дополнительно описано в данном документе.

Для экспериментов с использованием компонентов, составленных в виде липидных наночастиц (ЛНЧ), компоненты растворяли в 100% этаноле в различных молярных соотношениях. РНК-карго (например, мРНК Cas9 и гРНК) растворяли в 25 мМ цитрате, 100 мМ NaCl, pH 5,0, что приводило к получению концентрации РНК-карго приблизительно 0,45 мг/мл.

Для экспериментов, описанных в примере 2, ЛНЧ формировали путем микрофлюидного смешивания растворов липидов и РНК, используя настольный прибор Precision Nanosystems NanoAssemblr™ Benchtop в соответствии с протоколом производителя. Во время смешивания поддерживали соотношение водного растворителя и органического растворителя 2:1, используя дифференциальные скорости потока. После смешивания ЛНЧ собирали, разводили водой (приблизительно 1:1 об./об.), выдерживали в течение 1 часа при комнатной температуре и дополнительно разводили водой (приблизительно 1:1 об./об.) перед окончательной заменой буфера. Окончательную замену буфера на 50 мМ Трис, 45 мМ NaCl, 5% (масс./об.) сахарозы, pH 7,5 (TSS), проводили на колонках для обессоливания PD-10 (GE). При необходимости составы концентрировали путем центрифугирования на 100 кДа центробежных фильтрах Amicon (Millipore). Потому полученную в результате смесь фильтровали, используя 0,2 мкм стерильный фильтр. Конечный ЛНЧ хранили при -80°C до дальнейшего использования. ЛНЧ составляли в молярном соотношении ионизируемый липид:холестерин:ДСФХ:ПЭГ2т-ДМГ, равном 45:44:9:2, с молярным отношением липидного амина к РНК-фосфату (N:P) около 4,5 и соотношением гРНК к мРНК 1:1 по массе.

Для экспериментов, описанных в других примерах, ЛНЧ получали, используя метод поперечного потока с использованием смешивания с ударной струей липида в этаноле с двумя объемами растворов РНК и одним объемом воды. Липид в этаноле смешивали с помощью смешивающей крестовины с двумя объемами раствора РНК. Четвертый поток воды смешивали с выходным потоком крестовины через встроенный тройник (смотрите WO2016010840, Фиг. 2). ЛНЧ выдерживали в течение 1 часа при комнатной температуре, а затем разводили водой (приблизительно 1:1 об./об.). Разведенные ЛНЧ концентрировали, используя фильтрацию с тангенциальным потоком на плоском картридже (Sartorius, НОММ 100 кДа), а потом проводили замену буфера посредством диафильтрации в 50 мМ Трис, 45 мМ NaCl, 5% (масс./об.) сахарозы, pH 7,5 (TSS). В альтернативном варианте окончательную замену буфера на TSS проводили с помощью обессоливающих колонок PD-10 (GE). При необходимости составы концентрировали путем центрифугирования на 100 кДа центробежных фильтрах Amicon (Millipore). Потому полученную в результате смесь фильтровали, используя 0,2 мкм стерильный фильтр. Конечные ЛНЧ хранили при 4 °С или -80°С до дальнейшего использования. ЛНЧ составляли в молярном соотношении ионизируемый липид:холестерин:ДСФХ:ПЭГ2т-ДМГ, равном 50:38:9:3, с молярным отношением липидного амина к РНК-фосфату (N:P) около 6,0 и соотношением гРНК к мРНК 1:1 по массе.

Культура клеток и in vitro доставка мРНК Cas9, гРНК и вставочных конструкций

Клетки Нера1-6

Клетки Нера 1-6 высевали при плотности 10000 клеток/лунка в 96-луночные планшеты. Через 24 часа клетки обрабатывали ЛНЧ и AAV. Перед обработкой среду из лунок отсасывали. ЛНЧ разводили до 4 нг/мкл в среде DMEM+10% ФБС и дополнительно разводили до 2 нг/мкл в 10% ФБС (в DMEM) и инкубировали при 37°С в течение 10 мин (при конечной концентрации 5% ФБС). Целевая МЗ AAV составляла 1еб с разведением в среде DMEM+10% ФБС. 50 μл вышеуказанных разбавленных ЛНЧ в 2 нг/мкл добавляли к клеткам (с доставкой в общей сложности 100 нг РНК-карго) с последующим добавлением 50 μл AAV. Обработку ЛНЧ и AAV проводили с разницей в несколько минут. Общий объем среды в ячейках составлял 100 μл. Через 72 часа после обработки и через 30 суток после обработки супернатант из этих обработанных клеток собирали для ELISA-анализа в отношении FIX человека, как описано ниже.

Первичные гепатоциты

Первичные гепатоциты мыши (ПГМ), первичные гепатоциты яванского макака (ПГЯ) и первичные гепатоциты человека (ПГЧ) размораживали и ресуспендировали в среде для размораживания гепатоцитов с добавками (ThermoFisher) с последующим центрифугированием. Супернатант сливали, а осажденные клетки ресуспендировали в среде для посева гепатоцитов с набором добавок (ThermoFisher). Клетки подсчитывали и высевали в покрытые коллагеном I Bio-coat 96-луночные планшеты при плотности 33000

клеток/лунка для ПГЧ, 50 000 клеток/лунка для ПГЯ и 15000 клеток/лунка для ПГМ. Высеянные клетки оставляли для осаждения и прикрепления на 5 часов в инкубаторе для тканевого культивирования при 37 °С и атмосфере с 5% CO₂. После инкубации клетки проверяли в отношении образования монослоя, трижды промывали с сохранением гепатоцитов и инкубировали при 37 °С.

Для экспериментов с использованием липидной пакетной доставки мРНК Cas9 и гРНК, каждую, отдельно разводили в 2 мг/мл в поддерживающей среде и добавляли по 2,9 μл каждой в лунки (в 96-луночной планшете Эппендорфа), содержащие 12,5 μл 50 мМ цитрата натрия, 200 мМ хлорида натрия при рН 5 и 6,9 μл воды. После этого добавляли 12,5 μл липидного пакетного состава с последующим добавлением 12,5 μл воды и 150 μл TSS. Каждую лунку разводили до 20 нг/μл (по отношению к общему содержанию РНК), используя поддерживающую среду для гепатоцитов, а затем разводили до 10 нг/μл (относительно общего содержания РНК) 6% свежей мышинной сывороткой. Среду отсасывали из клеток перед трансфекцией и добавляли к клеткам 40 μл смесей липидный пакет/РНК с последующим добавлением AAV (разведенного в поддерживающей среде) при 1,3 × 10⁵. Среду собирали через 72 часа после обработки для анализа, а клетки собирали для дополнительного анализа, как описано в данном документе.

Анализ с люциферазой

Для экспериментов, включающих обнаружение NanoLuc в клеточной среде, один объем субстрата для анализа люциферазы Nano-Glo® объединяли с 50 объемами буфера для анализа люциферазы Nano-Glo®. Анализ проводили на оборудовании Promega Glomax со временем интеграции 0,5 с, используя 1:10 разведение образцов (50 μл реагента+40 μл воды+10 μл клеточной среды).

Для экспериментов, включающих обнаружение тега HiBit в клеточной среде, белок LgBiT и внеклеточный субстрат Nano-GloR HiBiT разводили 1:100 и 1:50, соответственно, во внеклеточном буфере Nano-GloR HiBiT при комнатной температуре. Анализ проводили на оборудовании Promega Glomax со временем интеграции 1,0 с, используя 1:10 разведение образцов (50 μл реагента+40 μл воды+10 μл клеточной среды).

In vivo доставка ЛНЧ и/или AAV

Мышам вводили дозу AAV, ЛНЧ, как AAV, так и ЛНЧ, или носителей (ФСБ+0,001% плуроник для носителя AAV, TSS для носителя ЛНЧ) через боковую хвостовую вену. AAV вводили в объеме 0,1 мл на животное в количествах (векторных геномов/мышь, «вг/мш»), описанных в данном документе. ЛНЧ разводили в TSS и вводили в количествах, указанных в данном документе, в дозе около 5 μл/грамм массы тела. Как правило, мышам сначала вводили AAV, а затем, если это было нужно, ЛНЧ. В различные моменты времени после обработки брали сыворотку и/или ткань печени для определенных анализов, как дополнительно описано ниже.

ELISA-анализ фактора IX человека (hFIX)

Для *in vitro* исследований определяли общие уровни фактора IX человека, секретлируемого в клеточную среду, используя набор для ELISA для фактора IX человека

(Abcam, кат. № ab188393) в соответствии с протоколом производителя. Уровни секретируемого hFIX определяли количественно по стандартной кривой, используя 4-параметрическую логистическую аппроксимацию, и выражали в нг/мл среды.

Для *in vivo* исследований собирали кровь и выделяли сыворотку или плазму, как указано. Общие уровни фактора IX человека определяли, используя набор для ELISA для фактора IX человека (Abcam, кат. № ab188393) в соответствии с протоколом производителя. Сывороточные или плазменные уровни hFIX определяли количественно по стандартной кривой, используя 4-параметрическую логистическую аппроксимацию, и выражали в мкг/мл сыворотки.

Секвенирование нового поколения («NGS») и анализ эффективности целевого расщепления

Для выявления наличия вставок и делеций, внесенных за счет генного редактирования, например, в интроне 1 альбумина, использовали глубинное секвенирование. ПЦР-праймеры конструировали вокруг целевого сайта и амплифицировали представляющую интерес область генома. Конструирование последовательности праймеров выполняли как принято в данной области.

Дополнительную ПЦР проводили в соответствии с протоколами производителя (Illumina) для добавления химии для секвенирования. Ампликоны секвенировали на приборе Illumina MiSeq. Чтения выравнивали с референсным геномом после исключения тех, которые имели низкие оценки качества. Полученные в результате файлы, содержащие чтения, картировали на референсный геном (файлы BAM), где выбирали чтения, которые перекрывали представляющую интерес целевую область, и рассчитывали число чтений дикого типа в сравнении с числом чтений, содержащих вставку или делецию («индель»).

Процент редактирования (например, «эффективность редактирования» или «процент редактирования») определяется как общее количество чтений последовательностей со вставками или делециями («инделями») по сравнению с общим числом чтений последовательностей, включая дикий тип.

Анализ гибридизации *in situ*

BaseScore (ACDbio, Ньюарк, Калифорния) представляет специализированную технологию гибридизации РНК *in situ*, которая может обеспечить специфическое обнаружение соединений экзонов, например, в гибридном транскрипте мРНК, который содержит вставочный трансген (hFIX) и кодирующую последовательность из сайта вставки (например, экзон 1 альбумина). BaseScore использовался для измерения процента клеток печени, экспрессирующих гибридную мРНК.

Чтобы обнаружить гибридную мРНК, ACDbio (Newark, CA) были разработаны два зонда к гибридным мРНК, которые могут появляться после вставки двунаправленной конструкции. Один из зондов был разработан для обнаружения гибридной мРНК, возникающей в результате вставки конструкции в одной ориентации, тогда как другой зонд был разработан для обнаружения гибридной мРНК, возникающей в результате вставки конструкции в другой ориентации. Получали печени от разных групп мышей и

делали свежемороженые срезы. Анализ BaseScore с использованием одного зонда или объединенных зондов проводили в соответствии с протоколом производителя. Слайды сканировали и анализировали с помощью программного обеспечения HALO. Фон (группа, обработанная солевым раствором) в этом анализе составлял 0,58%.

Пример 2 - in vitro тестирование вставочных матриц с плечами гомологии и без них

В этом примере клетки Hepa1-6 культивировали и обрабатывали AAV, несущими вставочные матрицы различных форм (например, имеющие одноцепочечный геном («ssAAV») или самокомплементарный геном («scAAV»)), в присутствии или в отсутствие ЛНЧ, доставляющих мРНК Cas9 и G000551, например, как описано в примере 1 (n=3). AAV и ЛНЧ получали, как описано в примере 1. После обработки собирали среду для определения уровней фактора IX человека, как описано в примере 1.

Клетки Hepa1-6 представляют собой иммортализованную линию клеток печени мышей, которая продолжает делиться в культуре. Как проиллюстрировано на Фиг. 2 (72 часа после обработки), только вектор (scAAV, полученный из плазмиды P00204), содержащий 200 п. о. плечи гомологии, приводил к обнаруживаемой экспрессии hFIX. Использование AAV-векторов, полученных из P00123 (scAAV с отсутствием плеч гомологии) и P00147 (двунаправленная конструкция ssAAV с отсутствием плеч гомологии), не приводило к какой-либо обнаруживаемой экспрессии hFIX в этом эксперименте. Клетки поддерживали в культуре, и эти результаты были подтверждены при повторном анализе через 30 суток после обработки (данные не приведены).

Пример 3 - in vivo тестирование вставочных матриц с плечами гомологии и без них

В этом примере мышам обрабатывали AAV, полученным из тех же плазмид (P00123, P00204 и P00147), которые тестировали in vitro в примере 2. Дозируемые материалы получали и вводили, как описано в примере 1. Мышам C57Bl/6 вводили вводили (n=5 для каждой группы) 3e11 векторных геномов каждой (вг/мш), после этого - ЛНЧ, содержащие G000551 («G551»), в дозе 4 мг/кг (по отношению к общему содержанию РНК-карго). Через четыре недели после введения дозы животных умерщвляли и собирали ткань печени и сыворотку для анализа редактирования и экспрессии hFIX, соответственно.

Как проиллюстрировано на Фиг. 3А и в таблице 12, уровни редактирования в печени ~ 60% были обнаружены в каждой группе животных, получавших ЛНЧ, содержащую гРНК, нацеленную на интрон 1 мышинового альбумина. Однако, несмотря на устойчивые и согласующиеся уровни редактирования в каждой группе обработки, животные, получавшие двунаправленный вектор без плеч гомологии (вектор ssAAV, полученный из P00147) в комбинации с обработкой ЛНЧ, демонстрировали наибольший уровень экспрессии hFIX в сыворотке (Фиг. 3В и таблица 13).

Таблица 12. % инделей

Матрица	Среднее значение,	Ст. откл., индели (%)
---------	-------------------	-----------------------

	индели (%)	
scAAV с тупым концом (P00123)	66,72	4,09
ssAAV с тупым концом (P00147)	68,10	2,27
ssAAV с ГР (P00204)	70,16	3,68
Только ЛНЧ	68,24	6,47
Носитель	0,28	0,08

Таблица 13. Уровни фактора IX

Матрица	Среднее значение, фактор IX (мкг/мл)	Ст. откл., фактор IX (мкг/мл)
scAAV с тупым концом (P00123)	0,75	0,28
ssAAV с тупым концом (P00147)	2,92	1,04
ssAAV с ГР (P00204)	0,96	0,35
Только ЛНЧ	0	0
Носитель	0	0

Пример 4 - in vivo тестирование вставочных матриц ssAAV с плечами гомологии и без них

Эксперимент, описанный в этом примере был направлен на изучение эффекта включения плеч гомологии в ssAAV-векторы in vivo.

Дозируемые материалы, используемые в этом эксперименте, получали и вводили, как описано в примере 1. Мышам C57Bl/6 вводили вводили (n=5 для каждой группы) 3e11 вг/мш, после этого - ЛНЧ, содержащие G000666 («G666») или G000551 («G551»), в дозе 0,5 мг/кг (по отношению к общему содержанию РНК-карго). Через четыре недели после введения дозы сыворотку животных собирали для анализа экспрессии hFIX.

Как проиллюстрировано на Фиг. 4А и в таблице 14, использование ssAAV-векторов с асимметричными плечами гомологии (300/600 п. о. плечи, 300/2000 п. о. плечи и 300/1500 п. о. плечи для векторов, полученных из плазмид P00350, P00356 и P00362, соответственно) для вставки в сайт-мишень G551 приводило к уровням циркулирующего hFIX, которые были меньше нижнего предела обнаружения для анализа. Однако использование ssAAV-вектора (полученного из P00147) без плеч гомологии и с двумя открытыми рамками считывания (ОРС) hFIX в двунаправленной ориентации привело к обнаруживаемым уровням циркулирующего hFIX у каждого животного.

Аналогично, использование ssAAV-векторов с асимметричными плечами гомологии (500 п. о. плечи и 800 п. о. плечи для векторов, полученных из плазмид P00353

и P00354, соответственно) для вставки в сайт-мишень G666, приводило к более низким, но обнаруживаемым уровням по сравнению с использованием двунаправленного вектор без плеч гомологии (полученного из P00147) (смотрите Фиг. 4В и таблицу 15).

Таблица 14. - Сывороточные уровни hFIX

AAV	Среднее значение, сывороточный FIX (мкг/мл)	Ст. откл., сывороточный FIX (мкг/мл)
P00147	5,13	1,31
P00350	-0,22	0,08
P00356	-0,23	0,04
P00362	-0,09	0,16

Таблица 15. - Сывороточные уровни hFIX

AAV	Среднее значение, сывороточный FIX (мкг/мл)	Ст. откл., сывороточный FIX (мкг/мл)
P00147	7,72	4,67
P00353	0,20	0,23
P00354	0,46	0,26

Пример 5 - in vitro скрининг двунаправленных конструкций по целевым сайтам в первичных гепатоцитах мышей

Продемонстрировав, что двунаправленные конструкции с отсутствием плеч гомологии, превосходят векторы с другими конфигурациями, в описанном в этом примере эксперименте исследовали эффекты изменения акцепторов сплайсинга, используемых для формирования гибридного транскрипта между hFIX и экзон 1 альбумина, и изменения гРНК для нацеливания CRISPR/Cas9-опосредованной вставки. Эти разнообразные двунаправленные конструкции тестировали на панели целевых сайтов, используя 20 разных гРНК, нацеленных на интрон 1 мышинового альбумина, в первичных гепатоцитах мышей (ПГМ).

Материалы для доставки ssAAV и липидных пакетов, тестируемых в этом примере, получали и доставляли в ПГМ, как описано в примере 1, с AAV при 1×10^5 . После обработки выделенную геномную ДНК и клеточную среду собирали для анализа редактирования и экспрессии трансгена, соответственно. Каждый из векторов содержал репортер, который можно измерить с помощью регистрации флуоресценции люциферазы, как описано в примере 1, которая отображена на графике на Фиг. 5С в виде относительных единиц люциферазы («ОЕЛ»). Векторы содержали пептид HiBit, слитый в 3' концах ОРС hFIX, что позволяет проводить чувствительное обнаружение относительной экспрессии. Схематические изображения каждого тестируемого вектора представлены на Фиг. 5А. Протестированные гРНК проиллюстрированы на Фиг. 5В и 5С с использованием сокращенных обозначений для тех, которые перечислены в таблице 5 (например, опущены первые нули, например, «G551» соответствует «G000551» в таблице

5).

Как проиллюстрировано на Фиг. 5B и в таблице 16, были обнаружены согласующиеся, но разные уровни редактирования для каждой из групп обработки для каждой тестируемой комбинации. Экспрессия трансгена при применении различных комбинаций матрицы и гидовой РНК проиллюстрирована на Фиг. 5C и в таблице 17. Как проиллюстрировано на Фиг. 5D, существенный уровень образования инделей не обязательно приводит к более эффективной экспрессии трансгенов. При применении полученных из P00411 и P00418 матриц значения R^2 составляли 0,54 и 0,37, соответственно, при этом направляющие с редактированием менее 10% не включены. Акцептор сплайсинга мышинового альбумина и акцептор сплайсинга человеческого FIX приводили к эффективной экспрессии трансгена.

Таблица 16. - % инделей

ID направляющей	P00411		P00418		P00415	
	Среднее значение, индели (%)	Ст. откл., индели (%)	Среднее значение, индели (%)	Ст. откл., индели (%)	Среднее значение, индели (%)	Ст. откл., индели (%)
G000551	67,4	1,42	70,67	2,29	66,73	4,90
G000552	90,93	0,15	91,10	2,43	90,37	1,01
G000553	77,80	3,83	77,47	1,87	80,50	0,85
G000554	72,37	6,49	70,53	3,16	70,60	2,91
G000555	35,37	2,63	35,77	9,34	40,47	4,75
G000666	62,47	3,87	50,90	19,41	65,90	3,99
G000667	30,57	2,73	25,30	3,67	31,67	2,29
G000668	63,60	2,02	66,65	4,60	68,30	4,90
G000669	19,10	2,51	19,33	1,53	18,70	1,25
G000670	47,80	3,27	49,10	4,42	51,97	2,06
G011722	4,20	0,72	4,27	1,20	4,20	0,26
G011723	5,63	1,27	6,07	0,15	5,93	0,15
G011724	6,10	1,28	8,50	2,69	7,13	1,27
G011725	1,93	0,29	2,60	0,79	2,53	0,65
G011726	10,73	1,46	11,70	0,50	12,43	1,33
G011727	14,20	1,56	14,80	2,36	16,20	2,69
G011728	10,55	1,20	13,65	0,92	15,50	1,56
G011729	5,00	0,10	5,63	0,25	6,00	1,01
G011730	7,83	0,97	9,13	0,59	7,33	0,59

G011731	23,70	0,66	25,27	1,21	24,87	1,01
Только AAV	0,15	0,07	0,05	0,07	0,10	0,00

Таблица 17. - Уровни люциферазы

ID направляющей	P00411		P00418		P00415	
	Среднее значение, люцифера за (ОЕЛ)	Ст. откл., люцифера за (ОЕЛ)	Среднее значение, люцифера за (ОЕЛ)	Ст. откл., люцифера за (ОЕЛ)	Среднее значение, люцифера за (ОЕЛ)	Ст. откл., люцифера за (ОЕЛ)
G000551	58000,00	4331,28	41800,00	2165,64	78633,33	20274,70
G000552	95700,00	10573,08	80866,67	27911,35	205333,33	30664,86
G000553	205333,33	52993,71	177333,33	32929,22	471666,67	134001,00
G000554	125333,33	55949,38	91933,33	19194,10	232666,67	67002,49
G000555	59933,33	11566,04	77733,33	11061,80	155666,67	15947,83
G000666	88500,00	28735,87	93266,67	30861,19	313000,00	15394,80
G000667	75333,33	22653,11	68966,67	27222,11	153000,00	30805,84
G000668	164000,00	56320,51	133400,00	65111,29	429000,00	120751,80
G000669	28933,33	11636,29	22033,33	2413,16	46466,67	6543,19
G000670	162666,67	32959,57	200000,00	33867,39	424666,67	36473,73
G011722	16766,67	3384,28	8583,33	4103,10	24000,00	8915,16
G011723	22733,33	7252,82	17133,33	4905,44	26100,00	8109,87
G011724	17300,00	2400,00	28033,33	9091,94	30933,33	3365,02
G011725	8253,33	1163,20	8890,00	1429,27	20366,67	13955,05
G011726	12223,33	3742,54	11610,00	2490,44	14950,00	8176,03
G011727	35600,00	8128,35	36300,00	12301,22	86700,00	5023,94
G011728	14900,00	5011,99	22466,67	7130,45	38166,67	13829,08
G011729	10460,00	2543,95	11223,33	2220,28	26966,67	16085,50
G011730	14833,33	2307,24	21700,00	8681,59	41233,33	25687,03
G011731	16433,33	3274,65	22566,67	2205,30	20756,67	13096,20
Только AAV	217,00	15,56	215,00	15,56	207,00	1,41

Пример 6 - in vivo скрининг двунаправленных конструкций по целевым сайтам

SsAAV и ЛНЧ, тестируемые в этом примере, получали и доставляли мышам C57Bl/6, как описано в примере 1, чтобы оценить эффективность двунаправленных конструкций в целевых сайтах in vivo. Через четыре недели после введения дозы животных умерщвляли и собирали ткань печени и сыворотку для анализа редактирования

и экспрессии hFIX, соответственно.

В первоначальном эксперименте 10 разных составов ЛНЧ, содержащих 10 разных гРНК, нацеленных на интрон 1 альбумина, доставляли мышам вместе с ssAAV, полученным из P00147. AAV и ЛНЧ доставляли при 3×10^{11} вг/мш и 4 мг/кг (по отношению к общему содержанию РНК-карго), соответственно ($n=5$ для каждой группы). гРНК, тестируемые в этом эксперименте, проиллюстрированы на Фиг. 6 и приведены в таблице 18. Как проиллюстрировано на Фиг. 6 и как наблюдалось *in vitro*, существенный уровень образования инделей не был прогностическим в отношении вставки или экспрессии трансгенов.

В отдельном эксперименте панель из 20 гРНК, нацеленных на 20 разных целевых сайтов, протестированных *in vitro* в примере 5, тестировали *in vivo*. С этой целью составы ЛНЧ, содержащие 20 гРНК, нацеленных на интрон 1 альбумина, доставляли мышам вместе с ssAAV, полученным из P00147. AAV и ЛНЧ доставляли при 3×10^{11} вг/мш и 1 мг/кг (по отношению к общему содержанию РНК-карго), соответственно. гРНК, тестируемые в этом эксперименте, проиллюстрированы на Фиг. 7А и 7В.

Как проиллюстрировано на Фиг. 7А и в таблице 19, были обнаружены различные уровни редактирования для каждой из групп обработки для каждой тестируемой комбинации ЛНЧ/вектор. Однако, как проиллюстрировано на Фиг. 7В и в таблице 20, и в соответствии с данными *in vitro*, описанными в примере 5, более высокие уровни редактирования не обязательно приводят к более высоким уровням экспрессии трансгенов *in vivo*, что указывает на отсутствие корреляции между редактированием и вставкой/экспрессией двунаправленных конструкций hFIX. Действительно, существует очень небольшая корреляция между уровнем обеспечиваемого редактирования и уровнем экспрессии hFIX, как проиллюстрировано на графике, представленном на Фиг. 7D. В частности, в этом эксперименте для наборов данных по редактированию и экспрессии получено значение R^2 , составляющее всего 0,34, при этом гРНК, демонстрирующее менее 10% редактирования, были удалены из анализа. Интересно, как проиллюстрировано на Фиг. 7С, представлен график корреляции, на котором приведено сравнение уровней экспрессии, измеренных в ОЕЛ, из *in vitro* эксперимента примера 5, с уровнями экспрессии трансгена, обнаруженными *in vivo* в этом эксперименте, со значением R^2 , равным 0,70, что демонстрирует положительную корреляцию между первичным клеточным скринингом и обработкой *in vivo*.

Чтобы оценить вставку двунаправленной конструкции на клеточном уровне, анализировали ткань печени обработанных животных, используя метод гибридизации *in situ* (BaseScore), например, как описано в примере 1. В этом анализе использовали зонды, которые могут обнаруживать соединения между трансгеном hFIX и последовательность экзона 1 мышинового альбумина в виде гибридного транскрипта. Как проиллюстрировано на Фиг. 8А, клетки, положительные в отношении гибридного транскрипта, были обнаружены у животных, которые получали как AAV, так и ЛНЧ. В частности, когда вводили только AAV, менее 1,0% клеток были положительными в отношении гибридного

транскрипта. При введении ЛНЧ, содержащих G011723, G000551 или G000666, 4,9%, 19,8% или 52,3% клеток были положительными в отношении гибридного транскрипта. Кроме того, как проиллюстрировано на Фиг. 8В, уровни циркулирующего hFIX коррелировали с числом клеток, положительных в отношении гибридного транскрипта. Наконец, в анализе использовали объединенные зонды, которые могут обнаруживать вставку двунаправленной конструкции hFIX в любой ориентации. Однако при применении одного зонда, который может обнаруживать только одну ориентацию, количество клеток, положительных в отношении гибридного транскрипта, составляло около половины от количества, обнаруженного при применении объединенных зондов (в одном примере 4,46% и 9,68%), что позволяет предположить, что двунаправленная конструкция действительно способна к вставке в любой ориентации, приводя к экспрессии гибридных транскриптов, что коррелирует с экспрессией трансгена на белковом уровне. Эти данные показывают, что достигаемые уровни циркулирующего hFIX зависят от направляющей, используемой для вставки.

Таблица 18 - Сывороточные уровни сыворотки hFIX и % инделей

Направляющая	Среднее значение, индели (%)	Ст. откл., индели (%)	Среднее значение, сывороточные уровни hFIX	Ст. откл., сывороточные уровни hFIX
G000551	75,02	1,27	3,82	3,38
G000555	51,18	1,19	32,56	9,05
G000553	62,78	2,64	25,07	4,04
G000667	52,96	4,96	32,03	6,74
G000554	55,24	2,28	29,48	7,34
G000552	67,56	1,73	14,79	5,34
G000668	43,14	5,78	26,72	7,97
G000669	50,68	2,97	10,70	4,43
G000666	64,62	1,34	26,19	5,56
G000670	55,90	1,30	30,96	8,44

Таблица 19 - % редактирования в печени

Направляющая	Среднее значение, редактирование в печени (%)	Ст. откл., редактирование в печени (%)
G000551	59,48	4,02
G000555	58,72	3,65
G000553	51,26	2,81
G000554	33,04	8,76

G000555	12,72	4,46
G000666	53,60	4,92
G000667	26,74	4,98
G000668	39,22	3,04
G000669	33,34	4,77
G000670	47,50	5,58
G011722	10,34	1,68
G011723	4,02	0,84
G011724	2,46	0,64
G011725	8,26	1,24
G011726	6,90	1,01
G011727	13,33	6,43
G011728	35,78	9,34
G011729	4,62	1,46
G011730	12,68	3,14
G011731	26,70	1,86

Таблица 20. - Сывороточные уровни hFIX

Направляющая	1 неделя		2 неделя		4 неделя	
	Среднее значение, FIX (мкг/мл)	Ст. откл., FIX (мкг/мл)	Среднее значение, FIX (мкг/мл)	Ст. откл., FIX (мкг/мл)	Среднее значение, FIX (мкг/мл)	Ст. откл., FIX (мкг/мл)
G000551	10,88	2,74	10,25	2,51	9,39	3,48
G000555	13,34	2,09	12,00	2,75	12,43	2,57
G000553	17,64	4,34	20,27	6,35	15,31	2,43
G000554	12,79	4,99	14,29	6,09	12,74	4,93
G000555	11,94	5,79	11,99	5,76	8,61	4,02
G000666	21,63	1,32	20,65	1,55	17,23	0,62
G000667	16,77	2,86	12,35	2,85	12,57	5,60
G000668	21,35	1,51	18,20	3,18	17,72	2,25
G000669	5,76	2,10	6,72	2,93	3,39	0,78
G000670	18,18	2,17	19,16	3,05	15,49	3,61
G011722	8,07	1,74	7,74	2,41	8,07	1,74
G011723	2,11	0,28	1,65	0,28	2,11	0,28

G011724	0,92	0,43	0,60	0,30	0,92	0,43
G011725	1,75	0,77	1,14	0,67	1,75	0,77
G011726	0,59	0,30	1,01	0,64	0,59	0,30
G011727	6,71	2,80	6,90	3,68	6,71	2,80
G011728	11,77	3,12	12,29	3,43	11,77	3,12
G011729	0,94	0,35	0,89	0,29	0,94	0,35
G011730	5,93	1,77	6,33	1,73	5,93	1,77
G011731	3,56	0,87	3,78	0,50	3,56	0,87
Только AAV	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Носитель	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Сыворотка человека	3,63	0,32	3,61	0,35	3,28	0,03

Пример 7 - время доставки AAV и ЛНЧ in vivo

В этом примере на мышах C57Bl/6 исследовали время между доставкой ssAAV, содержащего двунаправленную конструкцию hFIX, и ЛНЧ.

ssAAV и ЛНЧ, тестируемые в этом примере, получали и доставляли мышам, как описано в примере 1. Состав ЛНЧ содержал G000551, а двунаправленную матрицу доставляли в виде ssAAV, полученного из P00147. AAV и ЛНЧ доставляли при 3×10^{11} вг/мш и 4 мг/кг (по отношению к общему содержанию РНК-карго), соответственно (n=5 для каждой группы). Группа «только матрица» получала только AAV, а группа «ФСБ» не получала AAV или ЛНЧ. Одна группа получала AAV и ЛНЧ последовательно (с интервалом в несколько минут) на 0 сутки («матрица+ЛНЧ сутки 0»); другая группа получала AAV на 0 сутки и ЛНЧ на 1 сутки («матрица+ЛНЧ сутки 1»); и последняя группа получала AAV на 0 сутки и ЛНЧ на 7 сутки («матрица+ЛНЧ сутки 7»). Через 1, 2 и 6 недель собирали плазму для анализа экспрессии hFIX.

Как проиллюстрировано на Фиг. 9, hFIX был обнаружен в каждой группе в каждый анализируемый момент, за исключением временной точки, соответствующей 1 неделе, для группы, которая получала ЛНЧ на 7 сутки после доставки AAV.

Пример 8 - многократное дозирование ЛНЧ после доставки AAV

В этом примере исследовали эффекты повторного введения ЛНЧ после введения ssAAV.

ssAAV и ЛНЧ, тестируемые в этом примере, получали и доставляли мышам C57Bl/6, как описано в примере 1. Состав ЛНЧ содержал G000551, а ssAAV был получен из P00147. AAV и ЛНЧ доставляли при 3×10^{11} вг/мш и 0,5 мг/кг (по отношению к общему содержанию РНК-карго), соответственно (n=5 для каждой группы). Группа «только матрица» получала только AAV, а группа «ФСБ» не получала AAV или ЛНЧ. Одна группа получала AAV и ЛНЧ последовательно (с интервалом в несколько минут) на 0 сутки без дополнительной обработки («матрица+ЛНЧ (1x)» на Фиг. 10); другая группа получала

AAV и ЛНЧ последовательно (с интервалом в несколько минут) на 0 сутки и вторую дозу на 7 сутки («матрица+ЛНЧ (2x)» на Фиг. 10); и последняя группа получала AAV и ЛНЧ последовательно (с интервалом в несколько минут) на 0 сутки, вторую дозу ЛНЧ на 7 сутки и третью дозу ЛНЧ на 14 сутки («матрица+ЛНЧ (3x)» на Фиг. 10). Через 1, 2, 4 и 6 недель после введения AAV собирали плазму для анализа экспрессии hFIX.

Как проиллюстрировано на Фиг. 10, hFIX был обнаружен в каждой группе в каждый анализируемый момент времени, а несколько последующих доз ЛНЧ не приводили к существенному повышению уровня экспрессии hFIX.

Пример 9 - продолжительность экспрессии hFIX in vivo

В этом примере у обработанных животных оценивали продолжительность экспрессии hFIX по времени. С этой целью измеряли hFIX в сыворотке обработанных животных после введения дозы в рамках однолетнего исследования продолжительности.

ssAAV и ЛНЧ, тестируемые в этом примере, получали и доставляли мышам C57Bl/6, как описано в примере 1. Состав ЛНЧ содержал G000551, а ssAAV был получен из P00147. AAV доставляли при 3×10^{11} вг/мш, а ЛНЧ доставляли при 0,25 или 1,0 мг/кг (по отношению к общему содержанию РНК-карго) (n=5 для каждой группы).

Как проиллюстрировано на Фиг. 11А и в таблице 21, экспрессия hFIX сохранялась в каждый момент времени, оцениваемый для обеих групп, до 41 недели. Считается, что снижение уровней, наблюдаемое через 8 недель, связано с вариабельностью анализа ELISA. Уровни сывороточного альбумина измеряли с помощью ELISA на 2 и 41 неделе, что показало, что уровни циркулирующего альбумина поддерживаются на протяжении всего исследования.

Как проиллюстрировано на Фиг. 11В и в таблице 22, экспрессия hFIX сохранялась в каждый момент времени, оцениваемый для обеих групп, до 52 недели.

Таблица 21. Уровни FIX

Неделя	Доза			
	0,25 мг/кг ЛНЧ		1 мг/кг ЛНЧ	
	Среднее значение, hFIX (мкг/мл)	Ст. откл., hFIX (мкг/мл)	Среднее значение, hFIX (мкг/мл)	Ст. откл., hFIX (мкг/мл)
2	0,48	0,21	2,24	1,12
4	0,55	0,18	2,82	1,67
8	0,40	0,17	1,72	0,77
12	0,48	0,20	2,85	1,34
20	0,48	0,27	2,45	1,26
41	0,79	0,49	4,63	0,95

Таблица 22. - Уровни FIX

Неделя	Доза
--------	------

	0,25 мг/кг ЛНЧ		1 мг/кг ЛНЧ	
	Среднее значение, hFIX (мкг/мл)	Ст. откл., hFIX (мкг/мл)	Среднее значение, hFIX (мкг/мл)	Ст. откл., hFIX (мкг/мл)
2	0,87	0,15	4,02	1,75
8	0,99	0,15	4,11	1,41
12	0,93	0,14	4,15	1,35
20	0,83	0,22	4,27	1,54
41	0,83	0,37	4,76	1,62
52	0,82	0,25	4,72	1,54

Пример 10 - эффекты различных доз AAV и ЛНЧ для модуляции экспрессии hFIX in vivo

В этом примере эффекты изменения дозы как AAV, так и ЛНЧ для модуляции экспрессии hFIX оценивали на мышах C57Bl/6.

ssAAV и ЛНЧ, тестируемые в этом примере, получали и доставляли мышам, как описано в примере 1. Состав ЛНЧ содержал G000553, а ssAAV был получен из P00147. AAV доставляли при 1×10^{11} , 3×10^{11} , 1×10^{12} или 3×10^{12} вг/мыш, а ЛНЧ доставляли при 0,1, 0,3 или 1,0 мг/кг (по отношению к общему содержанию РНК-карго) (n=5 для каждой группы). Через две недели после введения дозы животных умерщвляли. Сыворотку собирали в два момента времени для анализа экспрессии hFIX.

Как проиллюстрировано на Фиг. 12А (1 неделя), Фиг. 12В (2 недели) и таблице 23, изменение дозы AAV или ЛНЧ может модулировать степень экспрессии hFIX in vivo.

Таблица 23. - Сывороточный hFIX

Момент времени	Доза РНП (мг/кг)	Доза AAV (МЗ)	Среднее значение, hFIX (мкг/мл)	СО	N
Неделя 1	0,1	1E+11	0,08	0,02	2
		3E+11	0,11	0,04	5
		1E+12	0,41	0,15	5
		3E+12	0,61	0,17	5
	0,3	1E+11	0,36	0,14	5
		3E+11	0,67	0,26	5
		1E+12	1,76	0,14	5
		3E+12	4,70	2,40	5
	1,0	1E+11	3,71	0,31	4
		3E+11	8,00	0,51	5

Момент времени	Доза РНП (мг/кг)	Доза AAV (МЗ)	Среднее значение, FIX (мкг/мл)	СО	N
		1E+12	14,17	1,38	5
		3E+12	20,70	2,79	5
	Сыворотка человека 1:1000		6,62	-	1
Неделя 2	0,1	1E+11	0,12	0,01	2
		3E+11	0,26	0,07	5
		1E+12	0,83	0,24	5
		3E+12	1,48	0,35	5
	0,3	1E+11	0,70	0,26	4
		3E+11	1,42	0,37	5
		1E+12	3,53	0,49	5
		3E+12	8,94	4,39	5
	1,0	1E+11	5,40	0,47	4
		3E+11	12,31	2,45	5
		1E+12	17,89	1,95	5
		3E+12	25,52	3,62	5
	Сыворотка человека 1:1000		4,47	-	1

Пример 11 - in vitro скрининг двунаправленных конструкций по целевым сайтам в первичных гепатоцитах яванского макака и человека

В этом примере ssAAV-векторы, содержащие двунаправленную конструкцию, тестировали на панели целевых сайтов, используя гРНК, нацеленные на интрон 1 альбумина яванского макака («яв. м.») и человека в первичных гепатоцитах яванского макака (ПГЯ) и первичных гепатоцитах человека (ПГЧ), соответственно.

Материалы для доставки ssAAV и липидных пакетов, тестируемые в этом примере, получали и доставляли в ПГЯ и ПГЧ, как описано в примере 1. После обработки выделенную геномную ДНК и клеточную среду собирали для анализа редактирования и экспрессии трансгена, соответственно. Каждый из векторов содержал репортер, который можно измерить с помощью регистрации флуоресценции люциферазы, как описано в примере 1 (полученных из плазмиды P00415), которая отображена на графиках на Фиг. 13В и 14В в виде относительных единиц люциферазы («ОЕЛ»). Например, AAV-векторы содержали OPC NanoLuc (в дополнение к ЗФБ). Схематические изображения тестируемых векторов представлены на Фиг. 13В и 14В. Протестированные гРНК проиллюстрированы на каждой из фигур с использованием сокращенного номера для тех, которые перечислены в таблице 1 и Таблице 7.

Как проиллюстрировано на Фиг. 13А для ПГЯ и на Фиг. 14А для ПГЧ, были

обнаружены различные уровни редактирования для каждой из тестируемых комбинаций (данные по редактированию для некоторых комбинаций, которые тестировали в эксперименте ПГЯ, не представлены на Фиг. 13А и в таблице 3 из-за неудачных экспериментов с определенными парами праймеров, используемых для секвенирования ампликона). Данные по редактированию, представленные на Фиг. 13А и 14А графически, численно отображены в таблице 3 и таблице 4 ниже. Однако, как проиллюстрировано на Фиг. 13В, 13С и Фиг. 14В и 14С, существенный уровень образования инделей не был прогностическим в отношении вставки или экспрессии трансгенов, что указывает на слабую корреляцию между редактированием и вставкой/экспрессией двунаправленных конструкций в ПГЯ и ПГЧ, соответственно. В качестве одного из показателей, значение R^2 , рассчитанное на Фиг. 13С, составляет 0,13, а значение R^2 на Фиг. 14D составляет 0,22.

Кроме того, ssAAV-векторы, содержащие двунаправленную конструкцию, тестировали на панели целевых сайтов, используя одинарные гидовые РНК, нацеленные на интрон 1 альбумина человека, в первичных гепатоцитах человека (ПГЧ).

Материалы ssAAV и липидных пакетов получали и доставляли в ПГЧ, как описано в примере 1. После обработки выделенную геномную ДНК и клеточную среду собирали для анализа редактирования и экспрессии трансгена, соответственно. Каждый из векторов содержал репортер, который можно измерить с помощью регистрации флуоресценции люциферазы, как описано в примере 1 (полученных из плазмиды P00415), которая отображена на графике на Фиг. 14D в виде относительных единиц люциферазы («ОЕЛ») и приведена в таблице 24 ниже. Например, AAV-векторы содержали OPC NanoLuc (в дополнение к ЗФБ). Схематические изображения тестируемых векторов представлены на Фиг. 13В и 14В. Протестированные гРНК проиллюстрированы на Фиг. 14D с использованием сокращенного номера для тех, которые перечислены в таблице 1 и таблице 7.

Таблица 3. Данные по редактированию интрона 1 альбумина для гРНК, доставленных в первичные гепатоциты яванского макака		
ID направляющей	Средн. % редактирования	Ст. откл. % редактирования
G009867	25,05	0,21
G009866	18,7	3,96
G009876	14,85	4,88
G009875	12,85	2,33
G009874	28,25	6,01
G009873	42,65	5,59
G009865	59,15	0,21
G009872	48,15	3,46
G009871	46,5	5,23

G009864	33,2	8,34
G009863	54,8	12,45
G009862	44,6	7,21
G009861	28,65	0,21
G009860	33,2	7,07
G009859	0,05	0,07
G009858	14,65	1,77
G009857	23	0,99
G009856	14,8	0,99
G009851	1,5	0,42
G009868	12,15	2,47
G009850	63,45	13,93
G009849	57,55	8,27
G009848	33	5,37
G009847	66,75	7
G009846	61,85	5,02
G009845	54,4	7,5
G009844	47,15	2,05

Таблица 4. Данные по редактированию интрона 1 альбумина для оГРНК, доставленных в первичные гепатоциты человека

ID направляющей	Средн. % редактирования	Ст. откл. % редактирования
G009844	19,07	2,07
G009851	0,43	0,35
G009852	47,20	3,96
G009857	0,10	0,14
G009858	8,63	9,16
G009859	3,07	3,50
G009860	18,80	4,90
G009861	10,27	2,51
G009866	13,60	13,55
G009867	12,97	3,04
G009868	0,63	0,32
G009874	49,13	0,60

G012747	3,83	0,23
G012748	1,30	0,35
G012749	9,77	1,50
G012750	42,73	4,58
G012751	7,77	1,16
G012752	32,93	2,27
G012753	21,20	2,95
G012754	0,60	0,10
G012755	1,10	0,10
G012756	2,17	0,40
G012757	1,07	0,25
G012758	0,90	0,10
G012759	2,60	0,35
G012760	39,10	6,58
G012761	36,17	2,43
G012762	8,50	0,57
G012763	47,07	3,07
G012764	44,57	5,83
G012765	19,90	1,68
G012766	8,50	0,28

Таблица 24. Скрининг направляющей hAlb с люциферазой

Направляющая	Среднее значение, люцифераза (ОЕЛ)	Ст. откл., люцифераза (ОЕЛ)
G009844	3700000	509116,9
G009852	281000	69296,46
G009857	1550000	127279,2
G009858	551000	108894,4
G009859	1425000	77781,75
G009860	2240000	183847,8
G009861	663500	238295
G009866	274000	11313,71
G009867	44700	565,6854
G009874	2865000	431335,1
G012747	651000	59396,97

G012749	867000	93338,1
G012752	4130000	268700,6
G012753	1145000	162634,6
G012757	579000	257386,9
G012760	129000	36769,55
G012761	4045000	728320
G012762	2220000	127279,2
G012763	1155000	205061
G012764	11900000	1555635
G012765	1935000	134350,3
G012766	2050000	169705,6
ЛНЧ	8430	212,132

Пример 12 - in vivo тестирование экспрессии фактора IX из альтернативного безопасного приемного локуса

В этом примере оценивали вставку ssAAV, содержащего двунаправленную конструкцию hFIX, в альтернативный безопасный приемный локус. Чтобы протестировать вставку в альтернативный безопасный приемный локус, получали AAV, как описано выше. Мышам вводили AAV в дозе 3e11 вг/мышь, за чем сразу следовало введение ЛНЧ, составленных с мРНК Cas9 и гидовыми РНК в дозе 0,3 мг/кг. Через 4 недели после введения дозы животных умерщвляли и собирали образцы печени и крови. Редактирование в образцах печени определяли методом NGS. Уровни hFIX человека в сыворотке определяли методом ELISA. Данные NGS и ELISA показали эффективную вставку и экспрессию hFIX в альтернативном безопасном приемном локусе.

Пример 13 - in vivo тестирование вставки гена фактора IX человека у отличных от человека приматов

В этом примере было проведено 8-недельное исследование для оценки вставки гена фактора IX человека и экспрессии белка hFIX у яванских макаков посредством введения аденоассоциированного вируса (AAV) и/или липидных наночастиц (ЛНЧ) с различными направляющими. Это исследование проводили с составами ЛНЧ и составами AAV, полученными, как описано выше. Каждый состав ЛНЧ содержал мРНК Cas9 и гидовую РНК (гРНК) с соотношением мРНК:гРНК 2:1 по массе. ssAAV был получен из P00147.

Самцов яванских макаков обрабатывали в группах по n=3. Животным вводили дозу AAV путем медленной болюсной инъекции или инфузии в дозах, описанных в таблице 10. После обработки AAV животные получали буфер или ЛНЧ, как описано в таблице 10, посредством медленного болюса или инфузии.

Через две недели после введения дозы собирали образцы печени с помощью однократной чрескожной биопсии под ультразвуковым контролем. Каждый образец

биопсии мгновенно замораживали в жидком азоте и хранили при температуре от -86 до -60 °С. Анализ редактирования образцов печени проводили с помощью секвенирования NGS, как описано ранее.

Для ELISA-анализа фактора IX у животных брали образцы крови на 7, 14, 28 и 56 сутки после введения дозы. Образцы крови собирали, перерабатывали в плазму после взятия крови и хранили при температуре от -86 до -60°С до анализа.

Общие уровни фактора IX человека определяли из образцов плазмы методом ELISA. Вкратце, 96-луночный микропланшет Reacti-Bind (VWR, кат. № PI15041) покрывали захватывающим антителом (мышинное mAb к фактору IX человека (HTI, кат. № ANIX-5041)) в концентрации 1 мкг/мл, затем блокировали, используя 1х ФСБ с 5% альбумина бычьей сыворотки. Затем тестируемые образцы или стандарты очищенного белка фактора IX человека (ERL, кат. № HFIX 1009, № партии HFIX4840), разведенного в плазме яванского макака, инкубировали в отдельных лунках. Антитела для обнаружения (поликлональные овечьи антитела к фактору 9 человека, Abcam, кат. № ab128048) адсорбировали в концентрации 100 нг/мл. Вторичное антитело (ослиное анти-овечьё IgG rAb с HRP, Abcam, кат. № ab97125) использовали в концентрации 100 нг/мл. Набор реагентов с ТМБ-субстратом (BD OptEIA кат. № 555214) использовали для проявления планшета. Оптическую плотность оценивали спектрофотометрически на 450 нм на микропланшет-ридере (система Molecular Devices i3) и анализировали с помощью SoftMax pro 6.4.

Было обнаружено образование инделей, подтверждающее, что редактирование произошло. Данные NGS показали эффективное образование инделей. Экспрессию hFIX из локуса альбумина в ОЧП измеряли методом ELISA, а результаты приведены в таблице 11 и на Фиг.15. Уровни hFIX в плазме достигли уровней, которые были ранее описаны как терапевтически эффективные (George, et al., NEJM 377(23), 2215-27, 2017).

По данным измерения уровни циркулирующего белка hFIX сохранялись на протяжении восьминедельного исследования (смотрите Фиг. 15, на которой проиллюстрированы средние уровни на 7, 14, 28 и 56 сутки, составляющие ~135, ~140, ~150 и ~110 нг/мл, соответственно) с достижением уровня белка от ~75 нг/мл до ~250 нг/мл. Плазменные уровни hFIX рассчитывали, используя удельную активность, которая в ~8 раз выше для гиперфункционального варианта hFIX R338L ((Simioni et al., NEJM 361(17), 1671-75, 2009) (в которой сообщается о белок-специфической активности hFIX-R338L, составляющей 390 ± 28 Е на миллиграмм, и белок-специфической активности для фактора IX дикого типа, составляющей $45 \pm 2,4$ Е на миллиграмм). Вычисления функционально нормализованной активности фактора IX для гиперфункционального варианта фактора IX, тестируемого в этом примере, показали, что эксперимент позволил достичь стабильных уровней белка фактора IX человека в ОЧП в течение 8-недельного исследования, что соответствует около 20-40% активности фактора IX дикого типа (диапазон составляет 12-67% активности фактора IX дикого типа).

Таблица 10. Редактирование в печени

ID животного	ID направляющей	F9-AAV (вг/кг)	Объем F9- AAV (мл/кг)	ЛПЧ (мг/кг)	Объем ЛПЧ (мл/кг)
4001	G009860	3E+13	1	3	2
4002	G009860	3E+13	1	3	2
4003	G009860	3E+13	1	3	2
5001	TSS	3E+13	1	0	0
5002	TSS	3E+13	1	0	0
5003	TSS	3E+13	1	0	0
6001	G009862	0	0	3	2
6002	G009862	0	0	3	2
6003	G009862	0	0	3	2

Таблица 11. Экспрессия hFIX

ID животного	Сутки 7 Фактор IX (нг/мл)	Сутки 14 Фактор IX (нг/мл)	Сутки 28 Фактор IX (нг/мл)	Сутки 56 Фактор IX (нг/мл)
4001	122,84/+2,85	94,93/+0,56	105,65/+1,94	97,31/+1,49
4002	149,77/+13,5	222,92/+9,61	252,49/+6,46	152,05/+7,46
4003	134,06/+6,17	107,04/+6,46	95,30/+3,18	74,23/+3,53
5001	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д
5002	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д
5003	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д
6001	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д
6002	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д
6003	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д

Пример 14 - in vivo тестирование вставки фактора IX у отличных от человека приматов

В этом примере проводили исследование для оценки вставки гена фактора IX и экспрессии белка hFIX у яванских макаков после введения ssAAV, полученного из липидных наночастиц P00147 и/или CRISPR/Cas9, с различными направляющими, содержащими G009860 и различные компоненты ЛПЧ.

Образование инделей определяли с помощью NGS, подтверждая, что

редактирование произошло. Общие уровни фактора IX человека определяли в образцах плазмы методом ELISA, используя мышинные mAB к фактору IX человека (HTI, кат. № АНIX-5041), поликлональные овечьи антитела к фактору 9 человека (Abscam, кат. № ab128048) и ослиные антиовечьи IgG pAb с HRP (Abscam, кат. № ab97125), как описано в примере 13. Уровни белка FIX человека, в > 3 раз превышающие уровни, достигнутые в эксперименте примера 13, были получены из двунаправленной матрицы с использованием альтернативных ЛНЧ CRISPR/Cas9. В этом исследовании результаты анализа ELISA показывают, что уровни циркулирующего белка hFIX, находящиеся на уровне или превышающие нормальный диапазон уровней FIX человека (3-5 мкг/мл; Amiral et al., Clin. Chem., 30(9), 1512-16, 1984), были достигнуты при применении G009860 в ОЧП как минимум на 14 и 28 сутки. Первоначальные данные показали, что уровни циркулирующего белка FIX человека составляют ~ 3-4 мкг/мл на 14 сутки после однократной дозы, при этом уровни сохранялись в течение первых 28 суток (~ 3-5 мкг/мл) исследования. Уровни FIX у человека измеряли по завершении исследования тем же методом, а данные представлены в таблице 25. Также тестировали дополнительные направляющие G009847, G009862 и G009864, и показали, что они облегчают вставку матрицы, экспрессирующей FIX, в исследовании на ОЧП.

Таблица 25. Сывороточные уровни белка фактора IX человека - метод ELISA из примера 13

	Сутки	Стд.	Сутки	Стд.	Сутки	Стд.	Сутки	Стд.	Сутки	Стд.
	7	Откл.	14	Откл.	28	Откл.	42	Откл.	56	Откл.
	FIX		FIX,	.	FIX,	.	FIX,	.	FIX,	.
	нг/мл		нг/мл		нг/мл		нг/мл		нг/мл	
3001	2532, 8	145,6	2562,6	99,0	3011,7	62,7	2936,7	72,4	2748,5	86,0
3002	2211, 4	95,8	2958,5	119,2	3350,2	98,4	3049,7	112,7	3036,7	90,6
3003	3195, 1	475,6	4433,9	238,7	3367,2	157,7	3746,1	95,6	3925,0	157,4

Уровни циркулирующего альбумина измеряли методом ELISA и показали, что исходные уровни альбумина сохранялись через 28 суток. Исследуемые уровни альбумина у необработанных животных в исследовании варьировались $\pm \sim 15\%$. У обработанных животных уровни циркулирующего альбумина изменялись минимально и не выходили за пределы нормального диапазона, при этом уровни восстанавливались до исходного уровня в течение одного месяца.

Уровни циркулирующего белка FIX человека также определяли методом сэндвич-иммуноанализа с большим динамическим диапазоном. Вкратце, 96-луночный планшет

MSD GOLD со стрептавидином SECTOR (Meso Scale Diagnostics, кат. L15SA-1) блокировали 1% блокирующим агентом ECL (Sigma, GERPN2125). После удаления блокирующего раствора на планшете иммобилизовали биотинилированное захватывающее антитело (Sino Biological, 11503-R044). Рекомбинантный белок FIX человека (Enzyme Research Laboratories, HFIX 1009) использовали для получения калибровочного стандарта в 0,5% блокирующем агенте ECL. После промывки в планшет добавляли калибровочные стандарты и образцы плазмы и инкубировали. После промывки в лунки добавляли антитело для обнаружения (Haematologic Technologies, ANIX-5041), конъюгированное с сульфо-тегом, и инкубировали. После вымывания всех несвязанных антител для обнаружения на лунки наносили буфер для считывания T. без какой-либо дополнительной инкубации планшет визуализировали на приборе MSD Quick Plex SQ120 и анализировали данные с помощью пакета программного обеспечения Discovery Workbench 4,0 (Meso Scale Discovery). Концентрации выражены как средние рассчитанные концентрации в мкг/мл. Для образцов N=3, если не указано звездочкой, в этом случае N=2. Экспрессия hFIX из локуса альбумина в обработанной исследуемой группе, измеренная с помощью MSD ELISA, приведена в таблице 26.

Таблица 26. Сывороточные уровни белка фактора IX человека - MSD ELISA

	Средняя расщ. конц. (мкг/мл)					
	3001		3002		3003	
Момент времени	Конц.	CV между анализами	Конц.	CV между анализами	Конц.	CV между анализами
Сутки 7	7,85	20%	5,63	14%	11,20	26%
Сутки 14	8,65	15%	11,06	18%	14,70	28%
Сутки 28	9,14	7%	14,12	7%	10,85	25%
Сутки 42	9,03	10%	33,12*	0%	13,22	13%
Сутки 56	10,24	13%	16,72	12%	33,84*	4%

Пример 15 - Нецелевой анализ направляющих альбумина человека

Биохимический метод (смотрите, например, Cameron et al., Nature Methods. 6, 600-606; 2017) использовали для определения потенциальных нецелевых геномных сайтов, расщепляемых Cas9, нацеленной на альбумин. В этом эксперименте проводили скрининг 13 оgРНК, нацеленных на человеческий альбумин, и две контрольные направляющие с известными нецелевыми профилями, используя выделенную геномную ДНК НЕК293. Число потенциальных нецелевых сайтов, обнаруженных с использованием концентрации направляющих 16 нМ в биохимическом анализе, приведено в таблице 27. Анализ позволил идентифицировать потенциальные нецелевые сайты для тестируемых оgРНК.

Таблица 27. Нецелевой анализ

ID гРНК	Мишень	Направляющая последовательность (SEQ ID NO:)	Число нецелевых сайтов
G012753	Альбумин	GACUGAAACUUCACAGAAUA (SEQ ID NO: 20)	62
G012761	Альбумин	AGUGCAAUGGAUAGGUCUUU (SEQ ID NO: 28)	75
G012752	Альбумин	UGACUGAAACUUCACAGAAU (SEQ ID NO: 19)	223
G012764	Альбумин	CCUCACUCUUGUCUGGGCAA (SEQ ID NO: 31)	3985
G012763	Альбумин	UGGGCAAGGGAAGAAAAAAA (SEQ ID NO: 30)	5443
G009857	Альбумин	AUUUAUGAGAUCAACAGCAC (SEQ ID NO: 5)	131
G009859	Альбумин	UUAUUAAAGCAUAGUGCAA (SEQ ID NO: 7)	91
G009860	Альбумин	UAAAGCAUAGUGCAAUGGAU (SEQ ID NO: 8)	133
G012762	Альбумин	UGAUUCCUACAGAAAAACUC (SEQ ID NO: 29)	68
G009844	Альбумин	GAGCAACCUCACUCUUGUCU (SEQ ID NO: 2)	107
G012765	Альбумин	ACCUCACUCUUGUCUGGGCA (SEQ ID NO: 32)	41
G012766	Альбумин	UGAGCAACCUCACUCUUGUC (SEQ ID NO: 33)	78
G009874	Альбумин	UAAUAAAUAUCAACAUCU (SEQ ID NO: 13)	53
G000644	EMX1	GAGUCCGAGCAGAAGAAGAA (SEQ ID NO: 1129)	304
G000645	VEGFA	GACCCCUCCACCCCGCCUC (SEQ ID NO: 1130)	1641

В известных анализах обнаружения нецелевых объектов, таких как биохимический

метод, который использовали выше, большое количество потенциальных нецелевых сайтов обычно восстанавливают при конструировании, чтобы «создать широкую сеть» для потенциальных сайтов, которые можно проверить в другом контексте, например, в представляющей интерес первичной клетке. Например, в биохимическом методе, как правило, число потенциальных нецелевых сайтов представлено в избытке, поскольку в анализе используется очищенная высокомолекулярная геномная ДНК, не содержащая клеточное окружение, а анализ зависит от используемой дозы РНП Cas9. Соответственно, потенциальные нецелевые сайты, идентифицированные этими методами, можно подтверждать, используя нацеленное секвенирование идентифицированных потенциальных нецелевых сайтов.

Пример 16. Использование гуманизированных в отношении альбумина мышей для скрининга гидовых РНК в отношении вставки F9 человека *in vivo*

Нашей целью было идентифицировать эффективные гидовые РНК для вставки hF9 в локус альбумина человека. С этой целью мы использовали мышей, у которых локус мышинового альбумина был заменен соответствующей геномной последовательностью человеческого альбумина, включая первый интрон (мыши ALB^{hu/hu}). Это позволило проверить эффективность вставки гидовых РНК, нацеленных на первый интрон человеческого альбумина, в контексте печени взрослого человека *in vivo*. Ставили два отдельных эксперимента на мышах с использованием мышей ALB^{hu/hu} для скрининга в общей сложности 11 гидовых РНК, каждая из которых нацелена на первый интрон локуса человеческого альбумина. Всех мышей взвешивали и проводили инъекцию через хвостовую вену на 0 сутки эксперимента. Кровь собирали на 1, 3, 4 и 6 неделях путем взятия крови из хвоста и отделяли плазму. Мышей умерщвляли на 7 неделе. Кровь собирали через полую вену и отделяли плазму. Также вырезали печень и селезенку.

В первом эксперименте получали и тестировали, как в примере 1, 6 ЛНЧ, содержащих мРНК Cas9 и следующие направляющие: G009852, G009859, G009860, G009864, G009874 и G012764. ЛНЧ разводили до 0,3 мг/кг (используя среднюю массу 30 граммов) и инъекцировали вместе с AAV8, упакованным двунаправленной вставочной матрицей hF9 в дозе 3E11 вирусных геномов на мышь. В каждой группе инъекцию проводили пяти самцам мышей ALB^{hu/hu} возрастом 12-14 недель. Пяти мышам из той же группы инъекцировали AAV8, упакованный промотором CAGG, функционально связанным с hF9, что приводит к эписомальной экспрессии hF9 (при 3E11 вирусных геномов на мышь). Было три группы отрицательного контроля с тремя мышами в группе, которым вводили только буфер, AAV8, упакованный только двунаправленной вставочной матрицей hF9, или только ЛНЧ-G009874.

В этом эксперименте получали и тестировали, как в примере 1, следующие ЛНЧ, содержащие мРНК Cas9 и следующие направляющие: G009860, G012764, G009844, G009857, G012752, G012753 и G012761. Их все разводили до 0,3 мг/кг (используя среднюю массу 40 граммов) и инъекцировали вместе с AAV8, упакованным двунаправленной вставочной матрицей hF9 в дозе 3E11 вирусных геномов на мышь. В

каждой группе инъекцию проводили пяти самцам мышей ALB^{hu/hu} возрастом 30 недель. Пяти мышам из той же группы инъектировали AAV8, упакованный промотором CAGG, функционально связанным с hF9, что приводит к эписомальной экспрессии hF9 (при 3E11 вирусных геномов на мышь). Было три группы отрицательного контроля с тремя мышами в группе, которым вводили только буфер, AAV8, упакованный только двунаправленной вставочной матрицей hF9, или только ЛНЧ-G009874.

Для анализа проводили ELISA, чтобы измерить у мышей уровни циркулирующего hFIX в каждый момент времени. С этой целью использовали наборы для ELISA для фактора IX человека (ab188393), а все планшеты исследовали с объединенной человеческой нормальной плазмой от George King Bio-Medical в качестве положительного аналитического контроля. Уровни экспрессии фактора IX человека в образцах плазмы в каждой группе на 6 неделе после инъекции проиллюстрированы на **Фиг. 16А и Фиг. 16В**. В соответствии с данными по *in vitro* вставке, при применении гидовой РНК G009852 были обнаружены низкие или отсутствующие сывороточные уровни фактора IX. В соответствии с отсутствием прилегающей последовательности РАМ в человеческом альбумине сывороточные уровни фактора IX не были обнаружены при применении гидовой РНК G009864. Экспрессию фактора IX в сыворотке наблюдали в группах, в которых применяли гидовые РНК G009859, G009860, G009874 и G0012764.

Селезенки и часть левой боковой доли всей печени были представлены для анализа методом секвенирования нового поколения (NGS). NGS использовали для оценки процента клеток печени со вставками/делециями (инделями) в гуманизованном локусе альбумина на 7 неделе после инъекции донора AAV-hF9 и ЛНЧ-CRISPR/Cas9. В соответствии с отсутствием прилегающей последовательности РАМ в человеческом альбумине не было обнаружено редактирования в печени при применении гидовой РНК G009864. Редактирование в печени наблюдали в группах, в которых применяли гидовые РНК G009859, G009860, G009874 и G012764 (данные не приведены).

Оставшуюся печень фиксировали в течение 24 часов в 10% нейтральном забуференном формалине, а затем переносили в 70% этанол. От четырех до пяти образцов из отдельных долей вырезали и отправили в HistoWisz, где их обработали и заключили в парафиновые блоки. Затем из каждого парафинового блока вырезали срезы размером пять микронов, и проводили BASESCOPE™ на Ventana Ultra Discovery (Roche), используя универсальную процедуру BASESCOPE™ и реагенты от Advanced Cell Diagnostics, а также специально разработанный зонд, нацеленный на уникальное соединение мРНК, образуемое между сигнальной последовательностью человеческого альбумина из первого интрона локуса альбумина ALB^{hu/hu} и транскриптом hF9 при успешной интеграции и транскрипции. Затем использовали программное обеспечение для визуализации HALO (Indica Labs) для количественной оценки процента положительных клеток в каждом образце. Средний процент положительных клеток во нескольких долях для каждого животного коррелировал с уровнями hFIX в сыворотке на 7 неделе. Результаты приведены на **Фиг. 17** и в **таблице 28**. Сывороточные уровни на 7 неделе и % положительных клеток

для мРНК hALB-hFIX сильно коррелируют ($r=0,89$; $R^2=0,79$).

Таблица 28. Данные по hFIX и BASESCOPE™ на 7 неделе.

Мышь	Направляющая	hFIX (мкг/мл) (7 неделя)	% мРНК зонда (4-5 срезов)	СТД % мРНК зонда	Общее число клеток
1	Буфер	Н/Д	0,09	0,03	152833
4	Только AAV	Н/Д	0,53	0,67	351084
7	Только ЛНЧ	Н/Д	0,48	0,33	75160
10	CAG F9	211,8	0,20	0,22	190277
15	G009852	Н/Д	0,30	0,09	144518
20	G009859	0,5	0,82	0,45	143817
21	G009859	0,5	0,88	0,43	160172
22	G009859	2,3	1,71	1,54	26015
23	G009859	3,8	2,74	0,59	183085
24	G009859	0,6	2,78	1,96	152424
25	G009860	5,6	12,46	5,80	78935
26	G009860	10,6	13,76	5,32	112252
27	G009860	9,7	14,80	5,45	201592
28	G009860	2,1	3,32	0,76	84710
29	G009860	3,0	1,52	0,35	203277
30	G009864	Н/Д	1,94	1,78	145807
35	G009874	1,7	2,42	1,14	126665
36	G009874	1,5	1,08	0,53	195861
37	G009874	2,1	1,02	1,29	181679
38	G009874	5,5	0,40	0,43	175359
39	G009874	1,5	0,44	0,18	205417
40	G012764	15,7	28,85	7,11	167824
41	G012764	19,6	19,17	8,23	70081
42	G012764	1,9	1,95	1,79	154742
43	G012764	7,7	4,38	0,68	114060
44	G012764	3,0	1,64	1,04	238623
43	DapB (-)	--	0,12	0,07	144730

Пример 17 - Применение гуманизированных в отношении альбумина мышей, скрещенных с мышами с нокаутом F9, для оценки функциональности вставленного человеческого F9 in vivo

В следующем исследовании тестировали функциональность вставленного hF9 на самцах мышей ALB^{ms/hu} x F9^{-/-}. Получали и тестировали, как в примере 1, ЛНЧ, содержащие мРНК Cas9 и следующие направляющие: G009860 (нацеленная на первый интрон локуса альбумина человека) и G000666 (нацеленная на первый интрон локуса альбумина мыши). G009860 разводили до 0,3 мг/кг, а G000666 разводили до 1,0 мг/кг (используя среднюю массу 31,2 грамма) и инъецировали обе вместе с AAV8, упакованным двунаправленной вставочной матрицей hF9 в дозе 3E11 вирусных геномов на мышью. В каждой группе инъекцию проводили пяти самцам мышей ALB^{ms/hu} x F9^{-/-} (возрастом 16 недель). Пяти мышам из той же группы инъецировали AAV8, упакованный промотором CAGG, функционально связанным с hF9, что приводит к эписомальной экспрессии hF9 (при 3E11 вирусных геномов на мышью). Было шесть животных отрицательного контроля с одной мышью на группу, которым вводили только буфер или только AAV8, упакованный двунаправленной вставочной матрицей hF9, и двумя мышами на группу, которым вводили только ЛНЧ-G009860 или ЛНЧ-G000666 в дозе 0,3 мг/кг и 1,0 мг/кг, соответственно.

Для анализа проводили ELISA, чтобы измерить у мышей уровни циркулирующего hFIX в каждый момент времени. С этой целью использовали наборы для ELISA для фактора IX человека (ab188393), а все планшеты исследовали с объединенной человеческой нормальной плазмой от George King Bio-Medical в качестве положительного аналитического контроля. Селезенки и часть левой боковой доли всей печени были представлены для анализа NGS.

Уровни экспрессии фактора IX человека в образцах плазмы в каждой группе через 1, 2 и 4 недели после инъекции проиллюстрированы на **Фиг. 18** и в **таблице 29**. Кроме того, результаты NGS, показывающие уровни вставки и делеции (инделей) в локусе альбумина в печени и селезенке, приведены в **таблице 29**. Как проиллюстрировано на **Фиг. 18** и в **таблице 29**, hFIX был обнаружен в плазме обработанных мышей Alb^{+hu}/F9^{-/-} на 1, 3 и 4 неделях, при этом анализ ELISA показал значения экспрессии 0,5-10 мкг/мл на 1, 3 и 4 неделях.

Таблица 29. Плазменные уровни FIX человека и результаты NGS.

Образец	Неделя 1 (мкг/мл)	Неделя 3 (мкг/мл)	Неделя 4 (мкг/мл)	Индель Печень	Индель Селезенка
S1 ФСБ	НПО	НПО	НПО	6,12	0,12
Только S18 AAV8	НПО	НПО	НПО	0,73	0,10
Только S2 G000666	НПО	НПО	НПО	37,48	0,92
Только S4 G000666	НПО	НПО	НПО	30,67	1,17
Только S19 G009860	НПО	НПО	НПО	12,25	0,31
Только S20	НПО	НПО	НПО	10,73	0,45

G009860					
S10 CAG	42,60	129,83	117,74	1,45	0,12
S14 CAG	35,55	82,25	100,95	0,08	0,11
S15 CAG	37,30	115,51	107,26	0,10	0,05
S16 CAG	36,39	81,27	116,24	0,05	0,10
S17 CAG	40,50	101,38	124,15	0,16	0,06
S5 AAV8+G000666	2,90	5,00	8,79	41,46	1,43
S6 AAV8+G000666	4,67	6,11	10,29	33,81	1,59
S7 AAV8+G000666	2,88	3,15	3,01	33,47	1,04
S8 AAV8+G000666	0,94	1,61	Без образца	36,54	1,34
S9 AAV8+G000666	7,14	7,53	7,23	30,63	1,38
S11 AAV8+G009860	0,73	0,62	0,86	11,15	0,52
S12 AAV8+G009860	0,52	0,43	0,47	7,05	0,39
S13 AAV8+G009860	1,71	1,89	0,93	18,38	0,57
S21 AAV8+G009860	1,21	2,79	0,59	13,44	0,22
S22 AAV8+G009860	2,06	1,03	2,37	18,06	0,19
Человек	4,00	3,91	4,12	Н/Д	Н/Д

Оставшуюся печень фиксировали в течение 24 часов в 10% нейтральном забуференном формалине, а затем переносили в 70% этанол. От четырех до пяти образцов из отдельных долей вырезали и отправили в HistoWiz, где их обработали и заключили в парафиновые блоки. Затем из каждого парафинового блока вырезали срезы размером пять микрон для анализа с помощью BASESCOPE™ на Ventana Ultra Discovery (Roche), используя универсальную процедуру BASESCOPE™ и реагенты от Advanced Cell Diagnostics, а также специально разработанный зонд, нацеленный на уникальное соединение мРНК, образуемое между сигнальной последовательностью человеческого или мышинного альбумина из первого интрона каждого соответствующего локуса альбумина мыши $ALB^{ms/hu}$ и трансгеном hF9 при успешной интеграции и транскрипции. Затем использовали программное обеспечение для визуализации HALO (Indica Labs) для количественной оценки процента положительных клеток в каждом образце.

Затем использовали взятую перед умерщвлением кровь для оценки функциональной коагуляционной активности с помощью активированного частичного

тромбопластинового времени (АЧТВ) и анализа образования тромбина (TGA). Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) представляет собой клиническое измерение активности внутреннего пути свертывания в плазме. Свертывание плазмы индуцируется добавлением эллаговой кислоты или каолина, которые активируют фактор свертывания XII во внутреннем пути (известном как контактный путь) свертывания, что впоследствии приводит к образованию фибрина из фибриногена после активации тромбина. Анализ АЧТВ обеспечивает оценку способности индивида генерировать сгусток, и эту информацию можно использовать для определения риска кровотечения или тромбоза. Для тестирования АЧТВ использовали полуавтоматическая настольная система (Diagnostica Stago Start 4) с электромеханическим методом обнаружения сгустков (система определения на основе вязкости) для оценки свертывания в плазме. В каждую кювету со стальным шариком, добавляли 50 мкл цитратной плазмы и инкубировали при 37 °С в течение 5 мин, а затем инициировали свертывание добавлением 50 мкл эллаговой кислоты (конечная концентрация 30 мкМ) при 37 °С в течение 300 секунд. После конечной активации свертывания путем добавления в каждую кювету 50 мкл 0,025 М хлорида кальция (конечная концентрация 8 мМ) стальной шарик начинал колебаться между двумя приводными катушками. Движение шарика регистрировала приемная катушка. Образование фибрина увеличивало вязкость плазмы до тех пор, пока шарик не переставал двигаться, что регистрировалось как время свертывания. Единственным измеряемым параметром было время свертывания. Эксперименты проводились в двух повторностях.

Анализ образования тромбина (TGA) представляет собой неклиническую оценку кинетики образования тромбина в активированной плазме. Образование тромбина является важным процессом свертывания крови, поскольку тромбин отвечает за активацию других факторов свертывания и образование дополнительного тромбина (посредством активации FXI) для превращения фибриногена в фибрин. Анализ образования тромбина обеспечивает оценку способности индивида генерировать тромбин, и эту информацию можно использовать для определения риска кровотечения или тромбоза. Для проведения TGA использовали откалиброванную автоматическую тромбограмму для оценки уровней образования тромбина на спектрофотометре (Thrombinograph™, Thermo Scientific). Для высокопроизводительных экспериментов использовали 96-луночные планшеты (Immulon II HB). В каждую лунку добавляли 55 мкл цитратной плазмы (4х разведенную солевым раствором в случае мышинной плазмы) и инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. Генерация тромбина индуцируется добавлением 15 мкл 2 мкМ эллаговой кислоты (конечная концентрация 0,33 мкМ) при 37 °С в течение 45 мин. Генерацию тромбина определяли после автоматического ввода в каждую лунку 15 мкл флуорогенного субстрата с 16 мМ CaCl₂ (FluCa; Thrombinoscope BV). Флуорогенный субстрат реагировал с образовавшимся тромбином, который непрерывно измеряли в плазме каждые 33 секунды в течение 90 минут на 460 нм. Интенсивность флуоресценции пропорциональна протеолитической активности тромбина.

Основными параметрами, измеряемыми при отслеживании, были время задержки, пиковое образование тромбина, время до пикового образования тромбина и потенциал эндогенного тромбина (ЕТР). Время задержки позволяет оценить время, необходимое для первоначального обнаружения тромбина в плазме. Пик представляет максимальное количество тромбина, образовавшееся в данный момент времени после активации. Время до пика генерации тромбина представляет время от начала каскада коагуляции до пика генерации тромбина. ЕТР представляет общее количество тромбина, образовавшееся в течение измеренных 60 минут. Эксперименты проводились в двух повторностях.

Как проиллюстрировано на **Фиг. 19** и в **таблице 30**, вставка трансгена hF9 с использованием, например, G000666 продемонстрировала восстановление свертывающей функции в анализе АЧТВ. Образцы отрицательного контроля только AAV и только ЛНЧ показали большее время АЧТВ, составляющее 45-60 секунд в солевом растворе. Положительный контроль CAGG и тестируемые образцы AAV8+ЛНЧ были ближе к нормальному человеческому АЧТВ в 28-34 секунды.

Таблица 30. АЧТВ и TGA-ЕА.

№ образца	в/в инъекция	4 неделя, F9, мкг/мл	Среднее АЧТВ (с)	Пик TGA-ЕА (нМ)
1	ФСБ	НПО	40,2	11,13
18	Только AAV	НПО	62,5	-1
2	Только ЛНЧ g666	НПО	53,9	-1
4	Только ЛНЧ g666	НПО	65,0	2,45
19	Только ЛНЧ G009860	НПО	34,1	42,83
20	Только ЛНЧ G009860	НПО	56,7	18,07
10	AAV+CAGG F9	117,74	41,1	42,65
14	AAV+CAGG F9	100,95	34,1	49,96
15	AAV+CAGG F9	107,26	42,2	49,49
16	AAV+CAGG F9	116,24	37,9	44,46
17	AAV+CAGG F9	124,15	44,1	38,02
5	AAV+g666	8,79	31,3	72,11
6	AAV+g666	10,29	32,6	90,14
7	AAV+g666	3,01	33,5	58,33
8	AAV+g666	без образца	Н/Д	Н/Д
9	AAV+g666	7,23	25,9	67,23
11	AAV+G009860	0,86	36,8	56,92

12	AAV+G009860	0,47	37,7	45,16
13	AAV+G009860	0,93	35,3	60,45
21	AAV+G009860	0,59	36,1	47,44
22	AAV+G009860	2,37	> 300	Сгустки в пробирке

Как проиллюстрировано на **Фиг. 20А**, **Фиг. 20В** и **Фиг. 21** и в **таблице 30**, вставка трансгена hF9 с использованием, например, G000666 продемонстрировала повышенное образование тромбина в анализе TGA-ЕА. Концентрации тромбина были выше в образцах положительного контроля CAGG и AAV8+ЛНЧ по сравнению с образцами отрицательного контроля.

В заключение, hFIX был обнаружен в плазме мышей Alb^{+*hu*}/ F9^{-/-} через 1, 3 и 4 недели, и было обнаружено, что экспрессируемый hFIX-R338L является функциональным, поскольку в анализе TGA происходило образование тромбина, а время свертывания АЧТВ было улучшено.

Интрон 1 альбумина человека (SEQ ID NO: 1)

GTAAGAAATCCATTTTTCTATTGTTCAACTTTTATTCTATTTTCCCAGTAAAAT
AAAGTTTTAGTAAACTCTGCATCTTTAAAGAATTATTTTGGCATTATTTCTAAAATG
GCATAGTATTTTGTATTTGTGAAGTCTTACAAGGTTATCTTATTAATAAAAATTCAAAC
ATCCTAGGTAAAAAAGGTCAGAATTGTTTAGTGACTGTAATTTTCTTTTG
CGCACTAAGGAAAGTGCAAAGTAACTTAGAGTGACTGAACTTCACAGAATAGGGT
TGAAGATTGAATTCATAACTATCCCAAAGACCTATCCATTGCACTATGCTTTATTTA
AAAACCACAAAACCTGTGCTGTTGATCTCATAAATAGAAGTGTATTTATATTTATTT
TCATTTTAGTCTGTCTTCTTGGTTGCTGTTGATAGACACTAAAAGAGTATTAGATATT
ATCTAAGTTTGAATATAAGGCTATAAATATTTAATAATTTTAAAATAGTATTCTTGG
TAATTGAATTATTCTTCTGTTTAAAGGCAGAAGAAATAATTGAACATCATCCTGAGT
TTTTCTGTAGGAATCAGAGCCCAATATTTTGAACAAATGCATAATCTAAGTCAAAT
GGAAAGAAATATAAAAAGTAAACATTATTACTTCTTGTTTTCTTCAGTATTTAACAAT
CSTTTTTTTTCTTCCCTTGCCCAG

Таблица 5. Гидовая РНК мышинового альбумина

ID направляющей	Направляющая последовательность	Геномные координаты мыши (mm10)	SEQ ID NO:
G000551	AUUUGCAUCUGAGAACCC UU	хром5:90461148-90461168	98
G000552	AUCGGGAACUGGCAUCUU CA	хром5:90461590-90461610	99
G000553	GUUACAGGAAAUCUGAA GG	хром5:90461569-90461589	100
G000554	GAUCGGGAACUGGCAUCU	хром5:90461589-90461609	101

	UC		
G000555	UGCAUCUGAGAACCCUUA GG	хром5:90461151-90461171	102
G000666	CACUCUUGUCUGUGGAAA CA	хром5:90461709-90461729	103
G000667	AUCGUUACAGGAAAAUCU GA	хром5:90461572-90461592	104
G000668	GCAUCUUCAGGGAGUAGC UU	хром5:90461601-90461621	105
G000669	CAAUCUUUAAAUAUGUUG UG	хром5:90461674-90461694	106
G000670	UCACUCUUGUCUGUGGAA AC	хром5:90461710-90461730	107
G011722	UGCUUGUAUUUUUCUAGU AA	хром5:90461039-90461059	108
G011723	GUAAAUAUCUACUAAGAC AA	хром5:90461425-90461445	109
G011724	UUUUUCUAGUAAUGGAAG CC	хром5:90461047-90461067	110
G011725	UUAUAUUAUUGAUUAUUAU UU	хром5:90461174-90461194	111
G011726	GCACAGAUUAAAACACUU AA	хром5:90461480-90461500	112
G011727	CACAGAUUAAAACACUUA AC	хром5:90461481-90461501	113
G011728	GGUUUUAAAAAUAAUAAU GU	хром5:90461502-90461522	114
G011729	UCAGAUUUUCCUGUAACG AU	хром5:90461572-90461592	115
G011730	CAGAUUUUCCUGUAACGA UC	хром5:90461573-90461593	116
G011731	CAAUGGUAAAUAAGAAAU AA	хром5:90461408-90461428	117
G013018	GGAAAUCUGAAGGUGGC	хром5:90461563-90461583	118

	AA		
G013019	GGCGAUCUCACUCUUGUC UG	хром5:90461717-90461737	119

Таблица 6. орРНК мышиноного альбумина и профиль модификации

ID направ ляющей	Полная последовательность	SEQ ID NO:	Модифицированная полная последовательность	SEQ ID NO:
G000551	AUUUGCAUCUGAGA ACCCUUGUUUUAGA GCUAGAAAUAAGCAA GUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAAC UUGAAAAAGUGGCA CCGAGUCGGUGCUU UU	120	mA*mU*mU*UGCAUCUGA GAACCCUUGUUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmA mCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU	142
G000552	AUCGGGAACUGGCA UCUUCA GUUUUAGAGCUAGA AAUAGC AAGUUAAAAUAAGG CUAGUC CGUUAUCAACUUGA AAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	121	mA*mU*mC*GGGAACUGG CAUCUUCAGUUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmA mCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU	143
G000553	GUUACAGGAAAAUC UGAAGG GUUUUAGAGCUAGA AAUAGC AAGUUAAAAUAAGG CUAGUC CGUUAUCAACUUGA AAAAGU GGCACCGAGUCGGU	122	mG*mU*mU*ACAGGAAAA UCUGAAGGGUUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmA mCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU	144

	GCUUUU			
G000554	GAUCGGGAACUGGC AUCUUC GUUUUAGAGCUAGA AAUAGC AAGUUAAAAUAAGG CUAGUC CGUUAUCAACUUGA AAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	123	mG*mA*mU*CGGGAACUG GCAUCUUCGUUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmA mCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU	145
G000555	UGCAUCUGAGAACC CUUAGG GUUUUAGAGCUAGA AAUAGC AAGUUAAAAUAAGG CUAGUC CGUUAUCAACUUGA AAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	124	mU*mG*mC*AUCUGAGAA CCCUUAGGGUUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmA mCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU	146
G000666	CACUCUUGUCUGUG GAAACA GUUUUAGAGCUAGA AAUAGC AAGUUAAAAUAAGG CUAGUC CGUUAUCAACUUGA AAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	125	mC*mA*mC*UCUUGUCUG UGGAAACAGUUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmA mCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU	147
G000667	AUCGUUACAGGAAA AUCUGA GUUUUAGAGCUAGA AAUAGC	126	mA*mU*mC*GUUACAGGA AAAUCUGAGUUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAAAAUA	148

	AAGUUAAAUAAGG CUAGUC CGUUAUCAACUUGA AAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU		AGGCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmA mCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU	
G000668	GCAUCUUCAGGGAG UAGCUU GUUUUAGAGCUAGA AAUAGC AAGUUAAAUAAGG CUAGUC CGUUAUCAACUUGA AAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	127	mG*mC*mA*UCUUCAGGG AGUAGCUUGUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmA mCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU	149
G000669	CAAUCUUUAAAUAU GUUGUG GUUUUAGAGCUAGA AAUAGC AAGUUAAAUAAGG CUAGUC CGUUAUCAACUUGA AAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	128	mC*mA*mA*UCUUUAAAU AUGUUGUGGUUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmA mCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU	150
G000670	UCACUCUUGUCUGU GGAAAC GUUUUAGAGCUAGA AAUAGC AAGUUAAAUAAGG CUAGUC CGUUAUCAACUUGA AAAAGU GGCACCGAGUCGGU	129	mU*mC*mA*CUCUUGUCU GUGGAAACGUUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmA mCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU	151

	GCUUUU			
G011722	UGCUUGUAUUUUUC UAGUAA GUUUUAGAGCUAGA AAUAGC AAGUUAAAAUAAGG CUAGUC CGUUAUCAACUUGA AAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	130	mU*mG*mC*UUGUAUUUU UCUAGUAAGUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmA mCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU	152
G011723	GUAAAUAUUCUACUA AGACAA GUUUUAGAGCUAGA AAUAGC AAGUUAAAAUAAGG CUAGUC CGUUAUCAACUUGA AAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	131	mG*mU*mA*AAUAUCUAC UAAGACAAGUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmA mCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU	153
G011724	UUUUUCUAGUAAUG GAAGCC GUUUUAGAGCUAGA AAUAGC AAGUUAAAAUAAGG CUAGUC CGUUAUCAACUUGA AAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	132	mU*mU*mU*UUCUAGUAA UGGAAGCCGUUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmA mCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU	154
G011725	UUAUAUUAUUGAUA UAUUUU GUUUUAGAGCUAGA AAUAGC	133	mU*mU*mA*UAUUAUUGA UAUAUUUUGUUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAAAAUA	155

	AAGUUAAAUAAGG CUAGUC CGUUAUCAACUUGA AAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU		AGGCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmA mCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU	
G011726	GCACAGAUUA AAC ACUUA GUUUUAGAGCUAGA AAUAGC AAGUUAAAUAAGG CUAGUC CGUUAUCAACUUGA AAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	134	mG*mC*mA*CAGAUUA ACACUUAAGUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmA mCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU	156
G011727	CACAGAUUA AAC CUUAAC GUUUUAGAGCUAGA AAUAGC AAGUUAAAUAAGG CUAGUC CGUUAUCAACUUGA AAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	135	mC*mA*mC*AGAUUA CACUUAACGUUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmA mCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU	157
G011728	GGUUUUAAAAUAA UAAUGU GUUUUAGAGCUAGA AAUAGC AAGUUAAAUAAGG CUAGUC CGUUAUCAACUUGA AAAAGU GGCACCGAGUCGGU	136	mG*mG*mU*UUUAAAAU AAUAAUGUGUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmA mCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU	158

	GCUUUU			
G011729	UCAGAUUUUCCUGU AACGAU GUUUUAGAGCUAGA AAUAGC AAGUUAAAAUAAGG CUAGUC CGUUAUCAACUUGA AAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	137	mU*mC*mA*GAUUUCCU GUAACGAUGUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmA mCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU	159
G011730	CAGAUUUUCCUGUA ACGAUC GUUUUAGAGCUAGA AAUAGC AAGUUAAAAUAAGG CUAGUC CGUUAUCAACUUGA AAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	138	mC*mA*mG*AUUUUCCUG UAACGAUCGUUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmA mCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU	160
G011731	CAAUGGUAAAUAAG AAAUA GUUUUAGAGCUAGA AAUAGC AAGUUAAAAUAAGG CUAGUC CGUUAUCAACUUGA AAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	139	mC*mA*mA*UGGUAAAUA AGAAAUAAGUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmA mCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU	161
G013018	GGAAAUCUGAAGG UGGCAA GUUUUAGAGCUAGA AAUAGC	140	mG*mG*mA*AAAUCUGAA GGUGGCAAGUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAAAAUA	162

	AAGUAAAAUAAGG CUAGUC CGUUAUCAACUUGA AAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU		AGGCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmA mCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU	
G013019	GGCGAUCUCACUCU UGUCUG GUUUUAGAGCUAGA AAUAGC AAGUAAAAUAAGG CUAGUC CGUUAUCAACUUGA AAAAGU GGCACCGAGUCGGU GCUUUU	141	mG*mG*mC*GAUCUCACU CUUGUCUGGUUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmA mCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU	163

Таблица 7. Гидовая РНК альбумина яванского макака

ID направляющей	Направляющая последовательность	Геномные координаты яванского макака (mf5)	SEQ ID NO:
G009844	GAGCAACCUCACUCUUGUCU	хром5:61198711-61198731	2
G009845	AGCAACCUCACUCUUGUCUG	хром5:61198712-61198732	165
G009846	ACCUCACUCUUGUCUGGGGA	хром5:61198716-61198736	166
G009847	CCUCACUCUUGUCUGGGGAA	хром5:61198717-61198737	167
G009848	CUCACUCUUGUCUGGGGAAG	хром5:61198718-61198738	168
G009849	GGGGAAGGGGAGAAAAAAAAA	хром5:61198731-61198751	169
G009850	GGGAAGGGGAGAAAAAAAAA	хром5:61198732-61198752	170
G009851	AUGCAUUUGUUUCAAAAUAU	хром5:61198825-	3

		61198845	
G009852	UGCAUUUGUUUCAAAAUAUU	хром5:61198826- 61198846	172
G009853	UGAUUCCUACAGAAAAAGUC	хром5:61198852- 61198872	4
G009854	UACAGAAAAAGUCAGGAUAA	хром5:61198859- 61198879	174
G009855	UUUCUUCUGCCUUUAAACAG	хром5:61198889- 61198909	175
G009856	UUAUAGUUUUAUAUUCAAAC	хром5:61198957- 61198977	176
G009857	AUUUAUGAGAUCAACAGCAC	хром5:61199062- 61199082	5
G009858	GAUCAACAGCACAGGUUUUG	хром5:61199070- 61199090	6
G009859	UUAAAUAAGCAUAGUGCAA	хром5:61199096- 61199116	7
G009860	UAAAGCAUAGUGCAAUGGAU	хром5:61199101- 61199121	8
G009861	UAGUGCAAUGGAUAGGUCUU	хром5:61199108- 61199128	9
G009862	AGUGCAAUGGAUAGGUCUUA	хром5:61199109- 61199129	182
G009863	UUACUUUGCACUUUCCUAG	хром5:61199186- 61199206	183
G009864	UACUUUGCACUUUCCUAGU	хром5:61199187- 61199207	184
G009865	UCUGACCUUUUAUUUUACCU	хром5:61199238- 61199258	185
G009866	UACUAAAACUUUAUUUUACU	хром5:61199367- 61199387	10
G009867	AAAGUUGAACAAUAGAAAAA	хром5:61199401- 61199421	11
G009868	AAUGCAUAAUCUAAGUCAAA	хром5:61198812-	12

		61198832	
G009869	AUUAUCCUGACUUUUUCUGU	хром5:61198860- 61198880	189
G009870	UGAAUUAUUCCUCUGUUUAA	хром5:61198901- 61198921	190
G009871	UAAUUUUCUUUUGCCCACUA	хром5:61199203- 61199223	191
G009872	AAAAGGUCAGAAUUGUUUAG	хром5:61199229- 61199249	192
G009873	AACAUCCUAGGUAAAAUAAA	хром5:61199246- 61199266	193
G009874	UAAUAAAAUCAAACAUCU	хром5:61199258- 61199278	13
G009875	UUGUCAUGUAUUUCUAAAAU	хром5:61199322- 61199342	195
G009876	UUUGUCAUGUAUUUCUAAAA	хром5:61199323- 61199343	196

Таблица 8. орРНК яванского макака и профили модификаций

ID направляющей	Полная последовательность	SEQ ID NO:	Модифицированная полная последовательность	SEQ ID NO:
G009844	GAGCAACCUCACU CUUGUCU GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU	34	mG*mA*mG*CAACCUCA CUCUUGUCUGUUUAG AmGmCmUmAmGmAmA mAmUmAmGmCAAGUU A AAAUAAGGCUAGUCCG UUAUCAmAmCmUmUm GmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGm AmGmUmCmGmGmUmG mCmU*mU*mU*mU	66
G009845	AGCAACCUCACUC UUGUCUG GUUUUAGAGCUA	198	mA*mG*mC*AACCUCAC UCUUGUCUGGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmA	231

	GAAAUAGC AAGUUAAAUA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU		mAmUmAmGmCAAGUU A AAAUAAAGGCUAGUCCG UUAUCAmAmCmUmUm GmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGm AmGmUmCmGmGmUmG mCmU*mU*mU*mU	
G009846	ACCUCACUCUUGU CUGGGGA GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAUA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU	199	mA*mC*mC*UCACUCUU GUCUGGGGAGUUUU AGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAA GUUAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCmGmG mUmGmCmU*mU*mU*m U	232
G009847	CCUCACUCUUGUC UGGGGA GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAUA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU	200	mC*mC*mU*CACUCUUG UCUGGGGAAGUUUUA GAmGmCmUmAmGmAm AmAmUmAmGmCAAGU UAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmU mGmCmU*mU*mU*mU	233
G009848	CUCACUCUUGUCU GGGGAAG GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAUA GGCUAGUC	201	mC*mU*mC*ACUCUUGU CUGGGGAAGGUUUU AGAmGmCmUmAmGmA mAmAmUmAmGmCAA GUUAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCm	234

	CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU		UmUmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCmGmG mUmGmCmU*mU*mU*m U	
G009849	GGGGAAGGGGAG AAAAAAA GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU	202	mG*mG*mG*GAAGGGG AGAAAAAAAAGUUUUA G AmGmCmUmAmGmAmA mAmUmAmGmCAAGUU AA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmG m AmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAm Gm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	235
G009850	GGGAAGGGGAGA AAAAAAA GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU	203	mG*mG*mG*AAGGGGA GAAAAAAAAGUUUUA G AmGmCmUmAmGmAmA mAmUmAmGmCAAGUU AA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmG m AmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAm Gm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	236
G009851	AUGCAUUUGUUU CAAAAUAU	35	mA*mU*mG*CAUUUGUU UCAAAAU AUGUUUUAG	67

	<p>GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU</p>		<p>AmGmCmUmAmGmAmA mAmUmAmGmCAAGUU AA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmG m AmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAm Gm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU</p>	
G009852	<p>UGCAUUUGUUUC AAAAUAUU GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU</p>	36	<p>mU*mG*mC*AUUUGUUU CAAAAUAUUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmA mAmUmAmGmCAAGUU AA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmG m AmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAm Gm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU</p>	68
G009853	<p>UGAUUCCUACAG AAAAAGUC GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU</p>	206	<p>mU*mG*mA*UCCUACA GAAAAGUCGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmA mAmUmAmGmCAAGUU AA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmG m AmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAm Gm</p>	239

			UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G009854	UACAGAAAAAGU CAGGAUAA GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU	207	mU*mA*mC*AGAAAAAG UCAGGAUAAGUUUAG AmGmCmUmAmGmA mAmUmAmGmCAAGUU AA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmG m AmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAm Gm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	240
G009855	UUUCUUCUGCCUU UAAACAG GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU	208	mU*mU*mU*CUUCUGCC UUUAAACAGGUUUUAG AmGmCmUmAmGmA mAmUmAmGmCAAGUU AA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmG m AmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAm Gm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	241
G009856	UUAUAGUUUUAU AUUCAAC GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU	209	mU*mU*mA*UAGUUUU AUAUCAAACGUUUUA G AmGmCmUmAmGmA mAmUmAmGmCAAGUU AA AAUAAGGCUAGUCCGU	242

	GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIIUU		UAUCAmAmCmUmUmG m AmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAm Gm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G009857	AUUUAUGAGAUC AACAGCAC GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIIUU	37	mA*mU*mU*UAUGAGA UCAACAGCACGUUUUA G AmGmCmUmAmGmAmA mAmUmAmGmCAAGUU AA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmG m AmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAm Gm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	69
G009858	GAUCAACAGCACA GGUUUUG GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIIUU	38	mG*mA*mU*CAACAGCA CAGGUUUUGGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmA mAmUmAmGmCAAGUU AA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmG m AmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAm Gm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	70
G009859	UUAAAUAAGCA	39	mU*mU*mA*AAUAAAGC	71

	<p>UAGUGCAA GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU</p>		<p>AUAGUGCAAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmA mAmUmAmGmCAAGUU AA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmG m AmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAm Gm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU</p>	
G009860	<p>UAAAGCAUAGUG CAAUGGAU GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU</p>	40	<p>mU*mA*mA*AGCAUAGU GCAAUGGAUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmA mAmUmAmGmCAAGUU AA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmG m AmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAm Gm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU</p>	72
G009861	<p>UAGUGCAAUGGA UAGGUCUU GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU</p>	41	<p>mU*mA*mG*UGCAAUGG AUAGGUCUUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmA mAmUmAmGmCAAGUU AA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmG m AmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAm</p>	73

			Gm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G009862	AGUGCAAUGGAU AGGUCUUA GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU	215	mA*mG*mU*GCAAUGGA UAGGUCUUAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmA mAmUmAmGmCAAGUU AA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmG m AmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAm Gm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	248
G009863	UUACUUUGCACU UUCCUUAG GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU	216	mU*mU*mA*CUUUGCAC UUUCCUUAGGUUUUAG AmGmCmUmAmGmA mAmUmAmGmCAAGUU AA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmG m AmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAm Gm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	249
G009864	UACUUUGCACUU UCCUUAGU GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC	217	mU*mA*mC*UUUGCACU UUCCUUAGUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmA mAmUmAmGmCAAGUU AA AAUAAGGCUAGUCCGU	250

	CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU		UAUCAmAmCmUmUmG m AmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAm Gm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G009865	UCUGACCUUUUA UUUUACCU GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU	218	mU*mC*mU*GACCUUUU AUUUUACCGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmA mAmUmAmGmCAAGUU AA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmG m AmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAm Gm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	251
G009866	UACUAAAACUUU AUUUUACU GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU	42	mU*mA*mC*UAAAACUU UAUUUUACUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmA mAmUmAmGmCAAGUU AA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmG m AmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAm Gm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	74
G009867	AAAGUUGAACAA UAGAAAAA	43	mA*mA*mA*GUUGAACAA AUAGAAAAAGUUUUAG	75

	<p>GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU</p>		<p>AmGmCmUmAmGmAmA mAmUmAmGmCAAGUU AA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmG m AmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAm Gm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU</p>	
G009868	<p>AAUGCAUAAUCU AAGUCAAA GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU</p>	44	<p>mA*mA*mU*GCAUAAUC UAAGUCAAGUUUAG AmGmCmUmAmGmAmA mAmUmAmGmCAAGUU AA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmG m AmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAm Gm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU</p>	76
G009869	<p>AUUAUCCUGACU UUUUCUGU GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU</p>	222	<p>mA*mU*mU*AUCCUGAC UUUUUCUGUGUUUAG AmGmCmUmAmGmAmA mAmUmAmGmCAAGUU AA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmG m AmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAm Gm</p>	255

			UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G009870	UGAAUUAUCCU CUGUUUAA GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU	223	mU*mG*mA*AUUAUCC UCUGUUUAAGUUUAG AmGmCmUmAmGmA mAmUmAmGmCAAGUU AA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmG m AmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAm Gm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	256
G009871	UAAUUUUCUUUU GCCCACUA GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU	224	mU*mA*mA*UUUUCUUU UGCCCACUAGUUUAG AmGmCmUmAmGmA mAmUmAmGmCAAGUU AA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUm GmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGm AmGmUmCmGmGmUmG mCmU*mU*mU*mU	257
G009872	AAAAGGUCAGAA UUGUUUAG GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG	225	mA*mA*mA*AGGUCAGA AUUGUUUAGGUUUUAG AmGmCmUmAmGmA mAmUmAmGmCAAGUU AA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmG m AmAmAmAmAmGmUmG	258

	UGCUUUU		mGmCmAmCmCmGmAm Gm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G009873	AACAUCCUAGGU AAAAUAAA GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU	226	mA*mA*mC*AUCCUAGG UAAAAUAAAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmA mAmUmAmGmCAAGUU AA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmG m AmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAm Gm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	259
G009874	UAAUAAAAUUCA AACAUCCU GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU	45	mU*mA*mA*UAAAAUUC AAACAUCCUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmA mAmUmAmGmCAAGUU AA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmG m AmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAm Gm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	77
G009875	UUGUCAUGUAUU UCUAAAAU GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA	228	mU*mU*mG*UCAUGUAU UUCUAAAAUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmA mAmUmAmGmCAAGUU AA	261

	GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU		AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmG m AmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAm Gm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G009876	UUUGUCAUGUAU UUCUAAAA GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU	229	mU*mU*mU*GUCAUGUA UUUCUAAAAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmA mAmUmAmGmCAAGUU AA AAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmG m AmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAm Gm UmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	262

Таблица 9. Компоненты и последовательности векторов

ID плазмиды	5' ИКП	1-ая ориентация			2-ая ориентация			3' ИКП
		Акцептор сплайсинг а	Трансген	Поли- А	Поли- А	Трансген	Акцептор сплайсинг а	
P00147	(SEQ ID NO: 263)	Акцептор сплайсинг а альбумина мыши (SEQ ID NO: 264)	Фактор IX человека (R338L) (SEQ ID NO: 265)	SEQ ID NO: 266	SEQ ID NO: 267	Фактор IX человека (R338L) (SEQ ID NO: 268)	Акцептор сплайсинг а альбумина мыши (SEQ ID NO: 269)	(SEQ ID NO: 270)
P00411	(SEQ ID NO: 263)	Акцептор сплайсинг а	Фактор IX	SEQ ID NO: 266	SEQ ID NO: 267	Фактор IX	Акцептор сплайсинг а	(SEQ ID NO: 270)

	NO: 263)	а фактора IX человека (SEQ ID NO: 271)	человека (R338L)- HiBit (SEQ ID NO: 272)	NO: 266	NO: 267	человека (R338L)- HiBit (SEQ ID NO: 273)	а фактора IX человека (SEQ ID NO: 274)	NO: 270)
P00415	(SEQ ID NO: 263)	Акцептор сплайсинг а альбумина мыши (SEQ ID NO: 264)	Nluc- P2A- GFP (SEQ ID NO: 275)	SEQ ID NO: 266	SEQ ID NO: 267	Nluc- P2A- GFP (SEQ ID NO: 276)	Акцептор сплайсинг а альбумина мыши (SEQ ID NO: 269)	(SEQ ID NO: 270)
P00418	(SEQ ID NO: 263)	Акцептор сплайсинг а альбумина мыши (SEQ ID NO: 264)	Фактор IX человека (R338L)- HiBit (SEQ ID NO: 272)	SEQ ID NO: 266	SEQ ID NO: 267	Фактор IX человека (R338L)- HiBit (SEQ ID NO: 273)	Акцептор сплайсинг а альбумина мыши (SEQ ID NO: 269)	(SEQ ID NO: 270)

Последовательность 5' ИКП (SEQ ID NO: 263):

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAA
GGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
GAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCCT

Акцептор сплайсинга альбумина мыши (1-ая ориентация) (SEQ ID NO: 264):

TAGGTCAGTGAAGAGAAGAACA AAAAGCAGCATATTACAGTTAGTTGTCTTC
ATCAATCTTTAAATATGTTGTGTGGTTTTTCTCTCCCTGTTTCCACAG

Фактор IX человека (R338L), 1-ая ориентация (SEQ ID NO: 265):

TTTCTTGATCATGAAAACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATA
ATTCAGGTA AATTGGAAGAGTTTGTTC AAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAA
GAAAAGTGTAGTTTTGAAGAAGCACGAGAAGTTTTTGA AACACTGAAAGAACAAC
TGAATTTTGG AAGCAGTATGTTGATGGAGATCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTTAAA
TGGCGGCAGTTGCAAGGATGACATTAATTCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATT
TGAAGGAAAGAACTGTGAATTAGATGTAACATGTAACATTAAGAATGGCAGATGCG
AGCAGTTTTGTAAAAATAGTGCTGATAACAAGGTGGTTTTGCTCCTGTA CTGAGGGAT
ATCGACTTGCAGAAAACCAGAAGTCCTGTGAACCAGCAGTGCCATTTCCATGTGGA
AGAGTTTTCTGTTTCACAACTTCTAAGCTCACCCGTGCTGAGACTGTTTTTCTCTGATG
TGGACTATGTA AATTCTACTGAAGCTGAAACCATTTTGGATAACATCACTCAAAGCA

CCCAATCATTTAATGACTTCACTCGGGTTGTTGGTGGAGAAGATGCCAAACCAGGTC
 AATTCCTTGGCAGGTTGTTTTGAATGGTAAAGTTGATGCATTCTGTGGAGGCTCTA
 TCGTTAATGAAAAATGGATTGTAAGTACTGCTGCCACTGTGTTGAAACTGGTGTAAAA
 TTACAGTTGTTCGACAGGTGAACATAATATTGAGGAGACAGAACATACAGAGCAAAAG
 CGAAATGTGATTCGAATTATTCCTCACCACAACACTACAATGCAGCTATTAATAAGTAC
 AACCATGACATTGCCCTTCTGGAAGTGGACGAACCCTTAGTGCTAAACAGCTACGTT
 ACACCTATTTGCATTGCTGACAAGGAATACACGAACATCTTCCTCAAATTTGGATCT
 GGCTATGTAAGTGGCTGGGGAAGAGTCTTCCACAAAGGGAGATCAGCTTTAGTTCTT
 CAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTGACCGAGCCACATGTCTTCTATCTACAAAGTTC
 ACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCTGGCTTCCATGAAGGAGGTAGAGATTCATGT
 CAAGGAGATAGTGGGGGACCCCATGTTACTGAAGTGGGAAGGGACCAGTTTCTTAAC
 TGGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGTGTGCAATGAAAGGCAAATATGGAATATATA
 CCAAGGTATCCCGGTATGTCAACTGGATTAAGGAAAAAACAAGCTCACTTAA

Поли-А (1-ая ориентация) (SEQ ID NO: 266):

CCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGC
 CTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAA
 TTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGG
 ACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGG
 CTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCC

Поли-А (2-ая ориентация) (SEQ ID NO: 267):

AAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATT
 GTTGTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATC
 ACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAAC
 TCATCAATGTATCTTATCATGTCTG

Фактор IX человека (R338L), 2-ая ориентация (SEQ ID NO: 268):

TTAGGTGAGCTTAGTCTTTTCTTTTATCCAATTCACGTAGCGAGAGACCTTCG
 TATAGATGCCATATTTCCCCTTCATCGCACATTCCTCCCCCAACTTATTATCCCGGT
 CAAGAAACTTGTTCCTTCGACTTCAGTGACGTGTGGTCCACCTGAATCACCTTGGCA
 TGAGTCGCGACCGCCCTCGTGAAACCCAGCACAAAACATGTTATTGTAATCGTAA
 ATTTCTGTGGACAGAAGACAGGTCGCTCTATCGACCAACGGGACGCGCAAATATTGC
 AGAACGAGGGCTGATCGACCTTTGTGGAAGACCCGCCCCCACCCTCACATATCC
 GCTCCCAAATTTCAAGAAGATATTTGTATATTCTTTATCGGCTATACAAATCGGGGT
 AACATAGGAGTTAAGTACGAGTGGCTCGTCCAGCTCCAGGAGGGCTATATCATGGT
 TGTACTTGTTTATAGCGGCATTATAATTGTGATGGGGTATGATCCTGATAACATTCCT
 TTTCTGTTCAAGTATGCTCAGTTTCTTCAATGTTGTGTTTCGCCAGCCACGACCGTAATC
 TTAACCCCCGTCTCGACACAGTGTGCGGCCGTTACAATCCACTTTTCATTGACTATG
 GAGCCCCCACAAAACGCGTTCGACTTTTCCGTTGAGCACCACTGCCATGGAAATTGG
 CCAGGTTTAGCGTCCTCGCCCCGACAACCCTAGTAAAGTCATTAATGACTGTGTG
 GATTGTGTTATATTATCAAGAATCGTTTCGGCTTCAGTAGAGTTAACGTAGTCCACA
 TCGGGAAAAACTGTCTCGGCCCTTGTCAACTTTGATGTCTGGGACACACTTACCCGA

CCGCACGGGAAGGGCACCGCCGGTTCACAGCTCTTTTGATTCTCAGCGAGCCGGTAG
 CCCTCAGTGCAACTACACACAACCTTTGTTGTCGGCGGAATTTTTACAGAATTGCTCG
 CATCGTCCATTTTTAATGTTGCAGGTGACGTCCAACCTCGCAGTTTTTTTCCTTCAAAAC
 CAAAAGGGCACCAACACTCGTAGGAATTTATATCGTCTTTACAACCTCCCCCATTCA
 GACATGGATTAGATTTCGATTGGTCCCCATCGACATATTGCTTCCAGAACTCAGTGG
 TCCGTTCTGTATTCTCAAACACCTCGCGCGCTTCTTCAAAACTGCATTTTTCTCCAT
 ACACTCTCGCTCCAAGTTCCTTGCACGAATTCTTCAAGCTTTCCTGAGTTATACSTT
 TTAGGCCGGTTAAGTATCTTATTCGCGTTTTTCGTGGTCCAGAAA

Акцептор сплайсинга альбумина мыши (2-ая ориентация) (SEQ ID NO: 269):

CTGTGGAAACAGGGAGAGAAAAACCACACAACATATTTAAAGATTGATGAA
 GACAACТАACTGТААТАТGCTGCTTTTTGTTCTTCTCTTCACTGACCTA

Последовательность 3' ИКП (SEQ ID NO: 270):

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTC
 ACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACSTTTGGTCCCGGCCTC
 AGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA

Акцептор сплайсинга фактора IX человека (1-ая ориентация) (SEQ ID NO: 271):

GATTATTTGGATTAAAAACAAAGACTTTCTTAAGAGATGТААААТТТТСАТГА
 TGTTTTCTTTTTTGCTAAAACTAAAGAATTATCTTTTACATTTСAG

Фактор IX человека (R338L)-HiBit (1-ая ориентация) (SEQ ID NO: 272):

TTTCTTGATCATGAAAACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATA
 ATTCAGGTAAATTGGAAGAGTTTGTTCААGGGAACSTTGAGAGAGAATGTATGGAA
 GAAAAGTGTAGTTTTGAAGAAGCACGAGAAGTTTTTGAAAACACTGAAAGAACAAC
 TGAATTTTGGAAGCAGTATGTTGATGGAGATCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTTAA
 TGGCGGCAGTTGCAAGGATGACATTAATCCTATGAATGTTGGTGTCCSTTTGGATT
 TGAAGGAAAGAACTGTGAATTAGATGТААСАТGТААСАТТААГААТGGCAGATGCG
 AGCAGTTTTGTAAAAATAGTGCTGATAACAAGGTGGTTTGCTCCTGTACTGAGGGAT
 ATCGACTTGCAGAAAACCAGAAGTCCTGTGAACCAGCAGTGCCATTTCCATGTGGA
 AGAGTTTCTGTTTCACAACTTCTAAGCTCACCCGTGCTGAGACTGTTTTCTCTGATG
 TGGACTATGТАААТТCTACTGAAGCTGAAACCATTTTGATAACATCACTCAAAGCA
 CCCAATCATTТААТGACTTCACTCGGGTTGTTGGTGGAGAAGATGCCAAACCAGGTC
 ААТТCCCTTGGCAGGTTGTTTTGAATGGTAAAGTTGATGCATTCTGTGGAGGCTCTA
 TCGTTAATGAAAAATGGATTGТААCTGCTGCCCACTGTGTTGAAACTGGTGTТАААА
 TTACAGTTGTСGСAGGTGAACATAATATTGAGGAGACAGAACATAСAGAGCAAAAG
 CGAAATGTGATTСGAATTATTCCTCACCACAACТАСААТGCAGCTATТААТАAGTAC
 AACCATGACATTGCCSTTCTGGAACТGGACGAACCCTTAGTGCTAAACAGCTACGTT
 ACACCTATTTGCATTGCTGACAAGGAATACACGAACATCTTCCTCAAATTTGGATCT
 GGCTATGТАAGTGGCTGGGGAAGAGTCTTCCACAАAGGGAGATCAGCTTTAGTTCTT
 CAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTTGACCGAGCCACATGTCTTCTATCTACAАAGTTC
 ACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCTGGCTTCCATGAAGGAGGTAGAGATTСATGT
 CAAGGAGATAGTGGGGGACCCCATGTTACTGAAGTGGAAAGGGACCAGTTTCTТААС

TGGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGTGTGCAATGAAAGGCAAATATGGAATATATA
 CCAAGGTCTCCCGGTATGTCAACTGGATTAAGGAAAAAACAAGCTCACTGTCAGC
 GGATGGAGACTGTTCAAGAAGATCAGCTAA

Фактор IX человека (R338L)-HiBit (2-ая ориентация) (SEQ ID NO: 273):

TTAGGAAATCTTCTTAAACAGCCGCCAGCCGCTCACGGTGAGCTTAGTCTTTT
 CTTTTATCCAATTCACGTAGCGAGAGACCTTCGTATAGATGCCATATTTCCCCTTCAT
 CGCACATTCCTCCCCCAACTTATTATCCCGGTCAAGAACTTGTTCTTCGACTTCA
 GTGACGTGTGGTCCACCTGAATCACCTTGGCATGAGTCGCGACCGCCCTCGTGAAAC
 CCAGCACAAAACATGTTATTGTAAATCGTAAATTTTCGTGGACAGAAGACAGGTTCG
 TCTATCGACCAACGGGACGCGCAAATATTGCAGAACGAGGGCTGATCGACSTTTGT
 GGAAGACCCGCCCCCACTCACATATCCGCTCCCAAATTTCAAGAAGATATTTG
 TATATTCTTTATCGGCTATACAAATCGGGGTAACATAGGAGTTAAGTACGAGTGGCT
 CGTCCAGCTCCAGGAGGGCTATATCATGGTTGTACTTGTTTATAGCGGCATTATAAT
 TGTGATGGGGTATGATCCTGATAACATTCSTTTTCTGTTTCAAGTATGCTCAGTTTCTTC
 AATGTTGTGTTTCGCCAGCCACGACCGTAATCTTAAACCCCGTCTCGACACAGTGTGC
 GGCCGTTACAATCCACTTTTCATTGACTATGGAGCCCCCACAACGCGTCGACTTT
 TCCGTTGAGCACCACCTGCCATGGAAATTGGCCAGGTTTAGCGTCTCGCCCCGAC
 AACCTAGTAAAGTCATTAATGACTGTGTGGATTGTGTTATATTATCAAGAATCGT
 TTCGGCTTCAGTAGAGTTAACGTAGTCCACATCGGGAAAAACTGTCTCGGCCCTTGT
 CAACTTTGATGTCTGGGACACACTTACCCGACCGCACGGGAAGGGCACCGCCGGTT
 CACAGCTCTTTTGATTCTCAGCGAGCCGGTAGCCCTCAGTGCAACTACACACAACCT
 TGTTGTCGGCGGAATTTTTACAGAATTGCTCGCATCGTCCATTTTTAATGTTGCAGGT
 GACGTCCAACCTCGCAGTTTTTTTCTTCAAACCAAAAGGGCACCAACACTCGTAGGA
 ATTTATATCGTCTTTACAACCTCCCCCATTCAGACATGGATTAGATTTCGATTGGTCC
 CCATCGACATATTGCTTCCAGAACTCAGTGGTCCGTTCTGTATTCTCAAACACCTCGC
 GCGCTTCTTCAAACCTGCATTTTTCTCCATACACTCTCGCTCCAAGTTCCTTGCAC
 GAATTCTTCAAGCTTTCCTGAGTTATACSTTTTAGGCCGGTTAAGTATCTTATTCGCG
 TTTTCGTGGTCCAGAAA

Акцептор сплайсинга фактора IX человека (2-ая ориентация) (SEQ ID NO: 274):

CTGAAATGTAAAAGAATAATTCTTTAGTTTTAGCAAAAAAGAAAACATCATG
 AAAATTTTACATCTCTTAAAGAAAGTCTTTGTTTTTAATCCAAATAATC

Nluc-P2A-GFP (1-ая ориентация) (SEQ ID NO: 275):

TTTCTTGATCATGAAAACGCCAACAATAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATA
 ATTCAGGTAATTTGGAAGAGTTTGTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAA
 GAAAAGTGTAGTTTTGAAGAAGCAGTATTCACSTTTGGAGGACTTTGTCTGGTACTGG
 AGGCAAACCGCTGGTTATAATCTCGACCAAGTACTGGAACAGGGCGGGGTAAGTTC
 CCTCTTTCAGAATTTGGGTGTAAGCGTACACCAATCCAGCGGATTGTGTTGTCTGG
 AGAGAACGGACTCAAAATTGACATCCATGTTATCATTCCATATGAAGGTCTCAGTGG
 AGACCAAAATGGGGCAGATCGAGAAGATTTTCAAGGTAGTTTACCCAGTCGACGATC
 ACCACTTCAAAGTCATTCTCCACTATGGCACACTTGTTATCGACGGAGTAACTCCTA

ATATGATTGATTACTTTGGTCGCCCCGTATGAGGGCATCGCAGTGTTTGATGGCAAAA
 AGATCACCGTAACAGGAACGTTGTGGAATGGGAACAAGATAATCGACGAGAGATTG
 ATAAATCCAGACGGGTCCTCCTGTTTCAGGGTTACAATTAACGGCGTCACAGGATG
 GAGACTCTGTGAACGAATACTGGCCACAAATTTTTCACTCCTGAAGCAGGCCGGAG
 ACGTGGAGGAAAACCCAGGGGCCCGTGAGCAAGGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGT
 GGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGT
 CCGGCGAGGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGC
 ACCACCGGCAAGCTGCCCCTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGC
 GTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCC
 GCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAA
 CTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCG
 AGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAG
 TACAATAACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCAT
 CAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCG
 ACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAAC
 CACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCA
 CATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCT
 GTACAAGGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAA

Nluc-P2A-GFP (2-ая ориентация) (SEQ ID NO: 276):

TTACACCTTCCTCTTCTTCTTGGGGCTGCCGCCGCCCTTGACAGCTCGTCCAT
 GCCCAGGGTGATGCCGGCGGGGTCACGAACCTCCAGCAGCACCATGTGGTCCCTCTT
 CTCGTTGGGGTCCTTGCTCAGGGCGCTCTGGGTGCTCAGGTAGTGGTTGTCGGGCAG
 CAGCACGGGGCCGTCGCCGATGGGGGTGTTCTGCTGGTAGTGGTTCGGCCAGCTGCA
 CGCTGCCGTCCTCGATGTTGTGCCTGATCTTGAAGTTCACCTTGATGCCGTTCTTCTG
 CTTGTCGGCCATGATGTACACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGTACTCCAGCTTGTGGCCC
 AGGATGTTGCCGTCCTCCTTGAAGTCGATGCCCTTCAGCTCGATCCTGTTACCAGG
 GTGTCGCCCTCGAACTTCACCTCGGCCCTGGTCTTGTAGTTGCCGTCGTCCTTGAAGA
 AGATGGTCTCTCCTGCACGTAGCCCTCGGGCATGGCGCTCTTGAAGAAGTCGTGCT
 GCTTCATGTGGTTCGGGGTACCTGCTGAAGCACTGCACGCCGTAGGTTCAGGGTGGTCA
 CCAGGGTGGGCCAGGGCACGGGCAGCTTGCCGGTGGTGCAGATGAACTTCAGGGTC
 AGCTTGCCGTAGGTGGCGTCGCCCTCGCCCTCGCCGCTCACGCTGAACTTGTGGCCG
 TTCACGTCGCCGTCCAGCTCCACCAGGATGGGCACCACGCCGGTGAACAGCTCCTCG
 CCCTTGCTCACGGGGCCGGGGTTCCTCCTCCACGTCGCCGGCCTGCTTCAGCAGGCTG
 AAGTTGGTGGCCAGGATCCTCTCGCACAGCCTCCAGCCGGTCACGCCGTTGATGGTC
 ACCCTGAACAGCAGGCTGCCGTCGGGGTTGATCAGCCTCTCGTCGATGATCTTGTG
 CCGTTCCACAGGGTGGCGGTCACGGTGCATCTTCTTGGCGTCGAACACGGCGATGCC
 TCGTAGGGCCTGCCGAAGTAGTCGATCATGTTGGGGGTACGCCGTCGATCACCAG
 GGTGCCGTAGTGCAGGATCACCTTGAAGTGGTGGTTCGTCCACGGGGTACACCACCTT
 GAAAATCTTCTCGATCTGGCCATCTGGTTCGCCGCTCAGGCCCTCGTAGGGGATGAT
 CACGTGGATGTGATCTTCAGGCCGTTCTCGCCGCTCAGCACGATCCTCTGGATGGG

GGTCACGCTCACGCCAGGTTCTGGAACAGGCTGCTCACGCCGCCCTGCTCCAGCAC
CTGGTCCAGGTTGTAGCCGGCGGTCTGCCTCCAGTCGCCACGAAGTCCTCCAGGGT
GAACACGGCCTCCTCGAAGCTGCACTTCTCCTCCATGCACTCCCTCTCCAGGTTGCC
CTGCACGAACTCCTCCAGCTTGCCGCTGTTGTACCTCTTGGGCCTGTTCAGGATCTTG
TTGGCGTTCTCGTGGTCCAGGAA

Полная последовательность P00147 (от ИКП до ИКП): (SEQ ID NO: 277)

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAA
GGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
GAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCSTAGATCTCTTAGGTCAGTGAA
GAGAAGAACAAAAAGCAGCATATTACAGTTAGTTGTCTTCATCAATCTTTAAATATG
TTGTGTGGTTTTTCTCTCCCTGTTTCCACAGTTTTTCTTGATCATGAAAACGCCAACA
AAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAATTCAGGTAAATTGGAAGAGTTTGTTCAA
GGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAGTGTAGTTTTGAAGAAGCACGAG
AAGTTTTTGAAAACACTGAAAGAACAACCTGAATTTTGAAGCAGTATGTTGATGGA
GATCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTTAAATGGCGGCAGTTGCAAGGATGACATTAAT
TCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTTGAAGGAAAGAACTGTGAATTAGATGTA
ACATGTAACATTAAGAATGGCAGATGCGAGCAGTTTTGTAAAAATAGTGCTGATAA
CAAGGTGGTTTTGCTCCTGTACTGAGGGATATCGACTTGCAGAAAACCAGAAGTCCTG
TGAACCAGCAGTGCCATTTCCATGTGGAAGAGTTTCTGTTTCACAACTTCTAAGCT
CACCCGTGCTGAGACTGTTTTTCTGATGTGGACTATGTAATTCTACTGAAGCTGA
AACCATTTTGGATAACATCACTCAAAGCACCCAATCATTTAATGACTTCACTCGGGT
TGTTGGTGGAGAAGATGCCAAACCAGGTCAATTCCTTGGCAGGTTGTTTTGAATGG
TAAAGTTGATGCATTCTGTGGAGGCTCTATCGTTAATGAAAATGGATTGTAAGTGC
TGCCCACTGTGTTGAAACTGGTGTTAAAATTACAGTTGTTCGCAGGTGAACATAATAT
TGAGGAGACAGAACATACAGAGCAAAAAGCGAAATGTGATTCTGAATTATTCCTCACC
ACAACACTACAATGCAGCTATTAATAAGTACAACCATGACATTGCCCTTCTGGAACTGG
ACGAACCCTTAGTGCTAAACAGCTACGTTACACCTATTTGCATTGCTGACAAGGAAT
ACACGAACATCTTCTCAAATTTGGATCTGGCTATGTAAGTGGCTGGGGAAGAGTCT
TCCACAAAGGGAGATCAGCTTTAGTTCTTCAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTTGACC
GAGCCACATGTCTTCTATCTACAAAGTTCACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCTG
GCTTCCATGAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAAGGAGATAGTGGGGGACCCCATGTT
ACTGAAGTGGAAGGGACCAGTTTCTTAACTGGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGTG
TGCAATGAAAGGCAAATATGGAATATATACCAAGGTATCCCGGTATGTCAACTGGA
TTAAGGAAAAAACAAGCTCACTTAACTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATC
TGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTC
CTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATT
CTGGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCA
GGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGG
GGCTCTAGGGGGTATCCCCAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATA
AAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATA

AAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTG
 TGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTTAGGTGAGCTTAGTCTTT
 TCTTTTATCCAATTCACGTAGCGAGAGACCTTCGTATAGATGCCATATTTCCCCTTCA
 TCGCACATTCTCCCCCAACTTATTATCCCGGTCAAGAACTTGTTCCCTTCGACTTC
 AGTGACGTGTGGTCCACCTGAATCACCTTGGCATGAGTCGCGACCGCCCTCGTGAAA
 CCCAGCACAAAACATGTTATTGTAAATCGTAAATTTTCGTGGACAGAAGACAGGTTCG
 CTCTATCGACCAACGGGACGCGCAAATATTGCAGAACGAGGGGCTGATCGACCTTTG
 TGGAAGACCCGCCCCACCCACTCACATATCCGCTCCCAAATTTCAAGAAGATATTT
 GTATATTCTTTATCGGCTATACAAATCGGGGTAAACATAGGAGTTAAGTACGAGTGGC
 TCGTCCAGCTCCAGGAGGGCTATATCATGGTTGTACTIONTTTATAGCGGCATTATAA
 TTGTGATGGGGTATGATCCTGATAACATTCCTTTTCTGTTTCAGTATGCTCAGTTTCTT
 CAATGTTGTGTTTCGCCAGCCACGACCGTAATCTTAACCCCGTCTCGACACAGTGTG
 CGGCCGTTACAATCCACTTTTCATTGACTATGGAGCCCCACAAAACGCGTCGACTT
 TTCCGTTGAGCACCACCTGCCATGGAAATTGGCCAGGTTTAGCGTCCTCGCCCCGA
 CAACCCTAGTAAAGTCATTAATGACTGTGTGGATTGTGTTATATTATCAAGAATCG
 TTTCGGCTTCAGTAGAGTTAACGTAGTCCACATCGGGAAAAACTGTCTCGGCCCTTG
 TCAACTTTGATGTCTGGGACACACTTACCCGACCGCACGGGAAGGGCACCGCCGGTT
 CACAGCTCTTTTGATTCTCAGCGAGCCGGTAGCCCTCAGTGCAACTACACACAACTT
 TGTTGTCGGCGGAATTTTTACAGAATTGCTCGCATCGTCCATTTTTTAATGTTGCAGGT
 GACGTCCAACCTCGCAGTTTTTTTCTTCAAAACCAAAAGGGCACCAACACTCGTAGGA
 ATTTATATCGTCTTTACAACCTCCCCCATTCAGACATGGATTAGATTTCGATTGGTCC
 CCATCGACATATTGCTTCCAGAACTCAGTGGTCCGTTCTGTATTCTCAAACACCTCGC
 GCGCTTCTTCAAACTGCATTTTTCTCCATACACTCTCGTCCAAGTTCCTTGCAC
 GAATTCTTCAAGCTTTCCTGAGTTATACCTTTTAGGCCGGTTAAGTATCTTATTCGCG
 TTTTCGTGGTCCAGAAAACTGTGGAAACAGGGAGAGAAAAACCACACAACATATT
 TAAAGATTGATGAAGACAACCTAACTGTAATATGCTGCTTTTTGTTCTTCTTCACTG
 ACCTAAGAGATCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCT
 CGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTTCG
 CCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGGAGTGGCCAA

Полная последовательность P00411 (от ИКП до ИКП): (SEQ ID NO: 278)

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGTCTCGTCACTGAGGCCGGGCGACCAAA
 GGTCGCCCCGACGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
 GAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCTAGATCTCTGATTATTTGGATT
 AAAAACAAGACTTTCTTAAGAGATGTAAAATTTTCATGATGTTTTCTTTTTTGCTAA
 AACTAAAGAATTATTCTTTTACATTTTCAGTTTTTTCTTGATCATGAAAACGCCAACAA
 AATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAATTCAGGTAAATTGGAAGAGTTTGTTC AAG
 GGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAGTGTAGTTTTGAAGAAGCACGAGA
 AGTTTTTGA AAAACACTGAAAGAACA ACTGAATTTTGAAGCAGTATGTTGATGGAG
 ATCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTTAAATGGCGGCAGTTGCAAGGATGACATTAATT
 CCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTTGAAGGAAAGAACTGTGAATTAGATGTAA

CATGTAACATTAAGAATGGCAGATGCGAGCAGTTTTGTAAAAATAGTGCTGATAAC
AAGGTGGTTTTGCTCCTGTACTGAGGGATATCGACTTGCAGAAAACCAGAAGTCCTGT
GAACCAGCAGTGCCATTTCCATGTGGAAGAGTTTTCTGTTTCACAACTTCTAAGCTC
ACCCGTGCTGAGACTGTTTTTCCTGATGTGGACTATGTAAATTCTACTGAAGCTGAA
ACCATTTTGGATAACATCACTCAAAGCACCCAATCATTTAATGACTTCACTCGGGTT
GTTGGTGGAGAAGATGCCAAACCAGGTCAATTCCCTTGGCAGGTTGTTTTGAATGGT
AAAGTTGATGCATTCTGTGGAGGCTCTATCGTTAATGAAAAATGGATTGTAAGTCT
GCCACTGTGTTGAAACTGGTGTAAAATTACAGTTGTCGCAGGTGAACATAATATT
GAGGAGACAGAACATAACAGAGCAAAGCGAAATGTGATTTCGAATTATTCCTCACCA
CAACTACAATGCAGCTATTAATAAGTACAACCATGACATTGCCCTTCTGGAAGTGA
CGAACCTTAGTGCTAAACAGCTACGTTACACCTATTTGCATTGCTGACAAGGAATA
CACGAACATCTTCCTCAAATTTGGATCTGGCTATGTAAGTGGCTGGGGAAGAGTCTT
CCACAAAGGGAGATCAGCTTTAGTTCTTCAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTTGACCG
AGCCACATGTCTTCTATCTACAAAGTTCACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCTGG
CTTCCATGAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAAGGAGATAGTGGGGGACCCCATGTTA
CTGAAGTGAAGGGACCAGTTTCTTAACTGGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGTGT
GCAATGAAAGGCAAATATGGAATATATACCAAGGTCTCCCGGTATGTCAACTGGAT
TAAGGAAAAACAAAGCTCACTGTCAGCGGATGGAGACTGTTCAAGAAGATCAGCT
AACCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCT
TCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATT
GCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGAC
AGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCT
CTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCAAAA
ACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTA
ACTTGTATTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCA
CAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTTGTCCAACTCATCAATGT
ATCTTATCATGTCTGTTAGGAAATCTTCTTAAACAGCCGCCAGCCGCTCACGGTGAG
CTTAGTCTTTTCTTTTATCCAATTCACGTAGCGAGAGACCTTCGTATAGATGCCATAT
TTCCCCTTCATCGCACATTCCTCCCCCAACTTATTATCCCGGTCAAGAACTTGTTT
CTTCGACTTCAGTGACGTGTGGTCCACCTGAATCACCTTGGCATGAGTCGCGACCGC
CCTCGTGAAACCCAGCACAAAACATGTTATTGTAAATCGTAAATTTTCGTGGACAGAA
GACAGGTCGCTCTATCGACCAACGGGACGCGCAAATATTGCAGAACGAGGGCTGAT
CGACCTTTGTGGAAGACCCGCCCCCACTCACATATCCGCTCCCAAATTTCAAG
AAGATATTTGTATATTCTTTATCGGCTATACAAATCGGGGTAACATAGGAGTTAAGT
ACGAGTGGCTCGTCCAGCTCCAGGAGGGCTATATCATGGTTGTACTTGTTTATAGCG
GCATTATAATTGTGATGGGGTATGATCCTGATAACATTCCTTTTCTGTTCAAGTATGCT
CAGTTTCTTCAATGTTGTGTTTCGCCAGCCACGACCGTAATCTTAAACCCCGTCTCGAC
ACAGTGTGCGGCCGTTACAATCCACTTTTCATTGACTATGGAGCCCCACAAAACGC
GTCGACTTTTCCGTTGAGCACCACCTGCCATGGAAATTGGCCAGGTTTAGCGTCCCTC
GCCCCGACAACCCTAGTAAAGTCATTAATGACTGTGTGGATTGTGTTATATTATC

AAGAATCGTTTTCGGCTTCAGTAGAGTTAACGTAGTCCACATCGGGAAAACTGTCTC
GGCCCTTGTCAACTTTGATGTCTGGGACACACTTACCCGACCGCACGGGAAGGGCAC
CGCCGGTTCACAGCTCTTTTGATTCTCAGCGAGCCGGTAGCCCTCAGTGCAACTACA
CACAACCTTTGTTGTCGGCGGAATTTTTACAGAATTGCTCGCATCGTCCATTTTTAATG
TTGCAGGTGACGTCCAACCTCGCAGTTTTTTTCCTTCAAAAACAAAAGGGCACCAACAC
TCGTAGGAATTTATATCGTCTTTACAACCTCCCCCATTCAGACATGGATTAGATTTCGC
ATTGGTCCCCATCGACATATTGCTTCCAGAACTCAGTGGTCCGTTCTGTATTCTCAA
CACCTCGCGCGCTTCTTCAAACTGCATTTTTCTCCATACACTCTCGCTCCAAGTTC
CCTTGCACGAATTCTTCAAGCTTTCCTGAGTTATACCTTTTAGGCCGGTTAAGTATCT
TATTCGCGTTTTTCGTGGTCCAGAAAACTGAAATGTAAAAGAATAATTCTTTAGTTT
TAGCAAAAAAGAAAACATCATGAAAATTTACATCTCTTAAGAAAGTCTTTGTTTTT
AATCCAAATAATCAGAGATCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTC
TGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCCGGGCGACC
TTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA

Полная последовательность P00415 (от ИКП до ИКП): (SEQ ID NO: 279)

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAA
GGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
GAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTAGATCTCTTAGGTCAGTGAA
GAGAAGAACAAAAAGCAGCATATTACAGTTAGTTGTCTTCATCAATCTTTAAATATG
TTGTGTGGTTTTTCTCTCCCTGTTTCCACAGTTTTTCTTGATCATGAAAACGCCAACA
AAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAATTCAGGTAAATTGGAAGAGTTTGTTCAA
GGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAGTGTAGTTTTGAAGAAGCAGTATT
CACTTTGGAGGACTTTGTCTGGTACTGGAGGCAAACCGCTGGTTATAATCTCGACCA
AGTACTGGAACAGGGCGGGGTAAGTTCCTCTTTCAGAATTTGGGTGTAAGCGTCAC
ACCAATCCAGCGGATTGTGTTGTCTGGAGAGAACGGACTCAA AATTGACATCCATGT
TATCATTCCATATGAAGGTCTCAGTGGAGACCAAATGGGGCAGATCGAGAAGATTT
TCAAGGTAGTTTACCCAGTCGACGATCACCCTTCAAAGTCATTCTCCACTATGGCA
CACTTGTTATCGACGGAGTAACTCCTAATATGATTGATTACTTTGGTCGCCCCGTATG
AGGGCATCGCAGTGTTTGATGGCAAAAAGATCACCGTAACAGGAACGTTGTGGAAT
GGGAACAAGATAATCGACGAGAGATTGATAAATCCAGACGGGTCACTCCTGTTTCAG
GGTTACAATTAACGGCGTCACAGGATGGAGACTCTGTGAACGAATACTGGCCACAA
ATTTTTCACTCCTGAAGCAGGCCGGAGACGTGGAGGAAAACCCAGGGCCCCGTGAGC
AAGGGCGAGGAGCTGTTCAACGGGGTGGTGCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGA
CGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACG
GCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCA
CCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACA
TGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGC
ACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGA
GGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACG
GCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGTCTATATC

ATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACAT
CGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCG
ACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCA
AAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCC
GGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGA
AGAGAAAGGTCTAACCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCC
CTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCTAATAA
AATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGG
GTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGG
ATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGG
TATCCCCAAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCA
ATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGC
ATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCA
AACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTTACACCTTCCTCTTCTTGGGGCTGCC
GCCGCCCTTGACAGCTCGTCCATGCCAGGGTGATGCCGGCGGGCGGTCACGAACTC
CAGCAGCACCATGTGGTCCCTCTTCTCGTTGGGGTCCTTGCTCAGGGCGCTCTGGGT
GCTCAGGTAGTGGTTGTGCGGCAGCAGCACGGGGCCGTCGCCGATGGGGGTGTTCT
GCTGGTAGTGGTCGGCCAGCTGCACGCTGCCGTCCTCGATGTTGTGCCTGATCTTGA
AGTTCACCTTGATGCCGTTCTTCTGCTTGTGCGCCATGATGTACACGTTGTGGCTGT
GTAGTTGTA CTCCAGCTTGTGGCCCAGGATGTTGCCGTCCTCCTTGAAGTCGATGCC
CTTCAGCTCGATCCTGTTCAACAGGGTGTCGCCCTCGAACTTCACCTCGGCCCTGGTC
TTGTAGTTGCCGTCGTCCTTGAAGAAGATGGTCCTCTCCTGCACGTAGCCCTCGGGC
ATGGCGCTCTTGAAGAAGTCGTGCTGCTTCATGTGGTCGGGGTACCTGCTGAAGCAC
TGCACGCCGTAGGTACAGGGTGGTCACCAGGGTGGGCCAGGGCACGGGCAGCTTGCC
GGTGGTGCAGATGAACTTCAGGGTCAGCTTGCCGTAAGTGGCGTCGCCCTCGCCCTC
GCCGCTCACGCTGAACTTGTGGCCGTTACGTCGCCGTCAGCTCCACCAGGATGGG
CACCACGCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACGGGGCCGGGGTTCTCCTCCAC
GTCGCCGGCCTGCTTCAGCAGGCTGAAGTTGGTGGCCAGGATCCTCTCGCACAGCCT
CCAGCCGGTCACGCCGTTGATGGTCACCCTGAACAGCAGGCTGCCGTCGGGGTTGAT
CAGCCTCTCGTCGATGATCTTGTGCGGTTCCACAGGGTGCCGGTCACGGTGATCTT
CTTGCCGTCGAACACGGCGATGCCCTCGTAGGGCCTGCCGAAGTAGTCGATCATGTT
GGGGGTCACGCCGTCGATCACCAGGGTGCCGTAAGTGCAGGATCACCTTGAAGTGGT
GGTCGTCCACGGGGTACACCACCTTGA AAAATCTTCTCGATCTGGCCCATCTGGTCGC
CGCTCAGGCCCTCGTAGGGGATGATCACGTGGATGTCGATCTTCAGGCCGTTCTCGC
CGCTCAGCACGATCCTCTGGATGGGGGTCACGCTCACGCCAGGTTCTGGAACAGG
CTGCTCACGCCGCCCTGCTCCAGCACCTGGTCCAGGTTGTAGCCGGCGGTCTGCCTC
CAGTCGCCACGAAGTCTCCAGGGTGAACACGGCCTCCTCGAAGCTGCACTTCTCC
TCCATGCACTCCCTCTCCAGGTTGCCCTGCACGAACCTCCTCCAGCTTGCCGCTGTTGT
ACCTCTTGGGCCTGTTCAAGGATCTTGTGGCGTTCTCGTGGTCCAGGAA

Полная последовательность P00418 (от ИКП до ИКП): (SEQ ID NO: 280)

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAA
GGTCGCCCCGACGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
GAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTAGATCTCTTAGGTCAGTGAA
GAGAAGAACAAAAAGCAGCATATTACAGTTAGTTGTCTTCATCAATCTTTAAATATG
TTGTGTGGTTTTTCTCTCCCTGTTTCCACAGTTTTTCTTGATCATGAAAACGCCAACA
AAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAATTCAGGTAAATTGGAAGAGTTTGTTCAA
GGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAGTGTAGTTTTGAAGAAGCACGAG
AAGTTTTTGAAAACACTGAAAGAACAACCTGAATTTTGAAGCAGTATGTTGATGGA
GATCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTTAAATGGCGGCAGTTGCAAGGATGACATTAAT
TCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTTGAAGGAAAGAAGTGTGAATTAGATGTA
ACATGTAACATTAAGAATGGCAGATGCGAGCAGTTTTGTAAAAATAGTGCTGATAA
CAAGGTGGTTTTGCTCCTGTACTGAGGGATATCGACTTGCAGAAAACCAGAAGTCCTG
TGAACCAGCAGTGCCATTTCCATGTGGAAGAGTTTCTGTTTCACAACTTCTAAGCT
CACCCGTGCTGAGACTGTTTTTCTGATGTGGACTATGTAATTCTACTGAAGCTGA
AACCATTTTGGATAACATCACTCAAAGCACCCAATCATTTAATGACTTCACTCGGGT
TGTTGGTGGAGAAGATGCCAAACCAGGTCAATTCCTTGGCAGGTTGTTTTGAATGG
TAAAGTTGATGCATTCTGTGGAGGCTCTATCGTTAATGAAAATGGATTGTAAGTGC
TGCCCACTGTGTTGAAACTGGTGTAAAATTACAGTTGTTCGCAGGTGAACATAATAT
TGAGGAGACAGAACATACAGAGCAAAAGCGAAATGTGATTCTGAATTATTCCTCACC
ACAACACTACAATGCAGCTATTAATAAGTACAACCATGACATTGCCCTTCTGGAACTGG
ACGAACCCTTAGTGCTAAACAGCTACGTTACACCTATTTGCATTGCTGACAAGGAAT
ACACGAACATCTTCCTCAAATTTGGATCTGGCTATGTAAGTGGCTGGGGAAAGAGTCT
TCCACAAAGGGAGATCAGCTTTAGTTCTTCAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTTGACC
GAGCCACATGTCTTCTATCTACAAAGTTCACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCTG
GCTTCCATGAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAAGGAGATAGTGGGGGACCCCATGTT
ACTGAAGTGGAAGGGACCAGTTTCTTAACTGGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGTG
TGCAATGAAAGGCAAATATGGAATATATACCAAGGTCTCCCGGTATGTCAACTGGA
TTAAGGAAAAACAAAGCTCACTGTCAGCGGATGGAGACTGTTCAAGAAGATCAGC
TAACCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCC
TTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAAT
TGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGA
CAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGC
TCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCAAAA
AACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTT
AACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTC
ACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATG
TATCTTATCATGTCTGTTAGGAAATCTTCTTAAACAGCCGCCAGCCGCTCACGGTGA
GCTTAGTCTTTTCTTTTATCCAATTCACGTAGCGAGAGACCTTCGTATAGATGCCATA
TTTCCCCTTCATCGCACATTCCTCCCCCAACTTATTATCCCGGTCAAGAACTTGTT
CCTTCGACTTCAGTGACGTGTGGTCCACCTGAATCACCTTGGCATGAGTCGCGACCG

CCCTCGTGAAACCCAGCACAAAACATGTTATTGTAAATCGTAAATTTTCGTGGACAGA
 AGACAGGTCGCTCTATCGACCAACGGGACGCGCAAATATTGCAGAACGAGGGGCTGA
 TCGACCTTTGTGGAAGACCCGCCCCACCCACTCACATATCCGCTCCCAAATTTCAA
 GAAGATATTTGTATATTCTTTATCGGCTATACAAATCGGGGTAACATAGGAGTTAAG
 TACGAGTGGCTCGTCCAGCTCCAGGAGGGCTATATCATGGTTGTACTTGTTTATAGC
 GGCATTATAATTGTGATGGGGTATGATCCTGATAACATTCCTTTTCTGTTTCAGTATGC
 TCAGTTTCTTCAATGTTGTGTTTCGCCAGCCACGACCGTAATCTTAACCCCCGTCTCGA
 CACAGTGTGCGGCCGTTACAATCCACTTTTCATTGACTATGGAGCCCCACAAAACG
 CGTCGACTTTTCCGTTGAGCACCACTGCCATGGAAATTGGCCAGGTTTAGCGTCCT
 CGCCCCGACAACCCTAGTAAAGTCATTAATGACTGTGTGGATTGTGTTATATTAT
 CAAGAATCGTTTCGGCTTCAGTAGAGTTAACGTAGTCCACATCGGGAAAAACTGTCT
 CGGCCCTTGTCAACTTTGATGTCTGGGACACACTTACCCGACCGCACGGGAAGGGCA
 CCGCCGGTTCACAGCTCTTTTGATTCTCAGCGAGCCGGTAGCCCTCAGTGCAACTAC
 ACACAACCTTTGTTGTCGGCGGAATTTTTACAGAATTGCTCGCATCGTCCATTTTAAAT
 GTTGCAGGTGACGTCCAACCTCGCAGTTTTTTCCTTCAAACCAAAGGGCACCAACA
 CTCGTAGGAATTTATATCGTCTTTACAACCTCCCCCATTTCAGACATGGATTAGATTTCG
 CATTGGTCCCATCGACATATTGCTTCCAGAACTCAGTGGTCCGTTCTGTATTCTCAA
 ACACCTCGCGCGCTTCTTCAAACCTGCATTTTTCTCCATACACTCTCGCTCCAAGTT
 CCCTTGCACGAATTCTTCAAGCTTTCCTGAGTTATACCTTTTAGGCCGGTTAAGTATC
 TTATTCGCGTTTTTCGTGGTCCAGAAAACTGTGGAAACAGGGAGAGAAAAACCACA
 CAACATATTTAAAGATTGATGAAGACAACCTAACTGTAATATGCTGCTTTTTGTTCTTC
 TCTTCACTGACCTAAGAGATCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCT
 CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCGGGCGTGGGGCGAC
 CTTTGGTCCGCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA

Полная последовательность P00123 (от ИКП до ИКП): (SEQ ID NO: 281)

GGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAG
 GTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG
 AGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCCTGGAGGGGTGGAGTCGTGATAG
 GTCAGTGAAGAGAAGAACA AAAAGCAGCATATTACAGTTAGTTGTCTTCATCAATC
 TTAAATATGTTGTGTGGTTTTTCTCTCCCTGTTTCCACAGTTTTTCTTGATCATGAAA
 ACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAATTCAGGTAAATTGGAAGAG
 TTTGTTCAAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAGTGTAGTTTTGAAGA
 AGCACGAGAAGTTTTTGA AAACACTGAAAGAACA ACTGAATTTTTGGAAGCAGTATG
 TTGATGGAGATCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTTAAATGGCGGCAGTTGCAAGGATG
 ACATTAATTCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTTGAAGGAAAGA ACTGTGAAT
 TAGATGTAACATGTAACATTAAGAATGGCAGATGCGAGCAGTTTTTGTA AAAATAGT
 GCTGATAACAAGGTGGTTTGCTCCTGTACTGAGGGATATCGACTTGCAGAAAACCA
 GAAGTCCTGTGAACCAGCAGTGCCATTTCCATGTGGAAGAGTTTCTGTTTCACAAAC
 TTCTAAGCTCACCCGTGCTGAGACTGTTTTTTCCTGATGTGGACTATGTAAATTCTACT
 GAAGCTGAAACCATTTTGGATAACATCACTCAAAGCACCCAATCATTTAATGACTTC

ACTCGGGTTGTTGGTGGAGAAGATGCCAAACCAGGTCAATTCCCTTGGCAGGTTGTT
 TTGAATGGTAAAGTTGATGCATTCTGTGGAGGCTCTATCGTTAATGAAAAATGGATT
 GTAACCTGCTGCCACTGTGTTGAAACTGGTGTAAAATTACAGTTGTCGCAGGTGAA
 CATAATATTGAGGAGACAGAACATACAGAGCAAAAAGCGAAATGTGATTTCGAATTAT
 TCCTCACCACAACACTACAATGCAGCTATTAATAAGTACAACCATGACATTGCCCTTCT
 GGAACCTGGACGAACCCTTAGTGCTAAACAGCTACGTTACACCTATTTGCATTGCTGA
 CAAGGAATACACGAACATCTTCCTCAAATTTGGATCTGGCTATGTAAGTGGCTGGGG
 AAGAGTCTTCCACAAAGGGAGATCAGCTTTAGTTCTTCAGTACCTTAGAGTTCCACT
 TGTTGACCGAGCCACATGTCTTCTATCTACAAAGTTCACCATCTATAACAACATGTT
 CTGTGCTGGCTTCCATGAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAAGGAGATAGTGGGGGAC
 CCCATGTTACTGAAGTGGAAGGGACCAGTTTCTTAACTGGAATTATTAGCTGGGGTG
 AAGAGTGTGCAATGAAAGGCAAATATGGAATATATACCAAGGTATCCCGGTATGTC
 AACTGGATTAAGGAAAAACAAAGCTCACTTAACTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCC
 AGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCC
 CACTGTCCTTTTCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCA
 TTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGAC
 AATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAAC
 CAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACTAGTCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTC
 GCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCGCCGACGCCCAGGGCTTTGCCCGGGCGG
 CCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGA

Полная последовательность P00204 (от ИКП до ИКП): (SEQ ID NO: 282)

GGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAG
 GTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG
 AGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTTGAGGGGTGGAGTCGTGACCT
 AGGTTCGTCTCCGGCTCTGCTTTTTCCAGGGGTGTGTTTCGCCGAGAAGCACGTAAGA
 GTTTTATGTTTTTTCATCTCTGCTTGTATTTTTCTAGTAATGGAAGCCTGGTATTTTAA
 AATAGTTAAATTTTCTTTAGTGCTGATTTCTAGATTATTATTACTGTTGTTGTTGTTA
 TTATTGTCATTATTTGCATCTGAGAACTAGGTCAGTGAAGAGAAGAACA AAAAGCA
 GCATATTACAGTTAGTTGTCTTCATCAATCTTTAAATATGTTGTGTGGTTTTTCTCTCC
 CTGTTTCCACAGTTTTTCTTGATCATGAAAACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAA
 AGAGGTATAATTCAGGTA AATTGGAAGAGTTTGTTC AAGGGAACCTTGAGAGAGAA
 TGTATGGAAGAAAAGTGTAGTTTTGAAGAAGCACGAGAAGTTTTTGAAAACACTGA
 AAGAACA ACTGAATTTTGAAGCAGTATGTTGATGGAGATCAGTGTGAGTCCAATC
 CATGTTTAAATGGCGGCAGTTGCAAGGATGACATTAATTCCTATGAATGTTGGTGTC
 CCTTTGGATTTGAAGGAAAGA ACTGTGAATTAGATGTAACATGTAACATTAAGAAT
 GGCAGATGCGAGCAGTTTTGTAAAAATAGTGCTGATAACAAGGTGGTTTGCTCCTGT
 ACTGAGGGATATCGACTTGCAGAAAACCAGAAGTCCTGTGAACCAGCAGTGCCATT
 TCCATGTGGAAGAGTTTCTGTTTCACAACTTCTAAGCTCACCCGTGCTGAGACTGT
 TTTTCTGATGTGGACTATGTAAATTCTACTGAAGCTGAAACCATTTTGGATAACAT
 CACTCAAAGCACCCAATCATTTAATGACTTCACTCGGGTTGTTGGTGGAGAAGATGC

CAAACCAGGTCAATTCCTTGGCAGGTTGTTTTGAATGGTAAAGTTGATGCATTCTG
 TGGAGGCTCTATCGTTAATGAAAAATGGATTGTAAGTCTGCTGCCCACTGTGTTGAAAC
 TGGTGTTAAAATTACAGTTGTCTGCAGGTGAACATAATATTGAGGAGACAGAACATA
 CAGAGCAAAAGCGAAATGTGATTCTGAATTATTCCTCACCACAACCTACAATGCAGCT
 ATTAATAAGTACAACCATGACATTGCCCTTCTGGAAGTGGACGAACCCTTAGTGCTA
 AACAGCTACGTTACACCTATTTGCATTGCTGACAAGGAATACACGAACATCTTCCTC
 AAATTTGGATCTGGCTATGTAAGTGGCTGGGGAAGAGTCTTCCACAAAGGGGAGATC
 AGCTTTAGTTCTTCAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTTGACCGAGCCACATGTCTTCTA
 TCTACAAAGTTCACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCTGGCTTCCATGAAGGAGGT
 AGAGATTCATGTCAAGGAGATAGTGGGGGACCCCATGTTACTGAAGTGGAAGGGAC
 CAGTTTCTTAACTGGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGTGTGCAATGAAAGGCAAAT
 ATGGAATATATACCAAGGTATCCCGGTATGTCAACTGGATTAAGGAAAAACAAAG
 CTCACTTAACTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCC
 CGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGA
 GGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGG
 GCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCG
 GTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCC
 CCCTTAGGTGGTTATATTATTGATATATTTTTGGTATCTTTGATGACAATAATGGGGG
 ATTTTGAAAGCTTAGCTTTAAATTTCTTTTAAATTAATAAAAAAATGCTAGGCAGAATG
 ACTCAAATTACGTTGGATACAGTTGAATTTATTACGGTCTCATAGGGCCTGCCTGCT
 CGACCATGCTATACTAAAAATTAAGGTGTACTAGTCCACTCCCTCTCTGCGCGCTC
 GCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCCCCGACGCCGGGCTTTGCCCGG
 GCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGA

Полная последовательность P00353 (от ИКП до ИКП): (SEQ ID NO: 283)

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAA
 GGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
 GAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCTAGATCTGATTTTGAAAGCTTA
 GCTTTAAATTTCTTTTAAATTAATAAAAAAATGCTAGGCAGAATGACTCAAATTACGTT
 GGATACAGTTGAATTTATTACGGTCTCATAGGGCCTGCCTGCTCGACCATGCTATAC
 TAAAAATTAAGGTGTGTGTTACTAATTTTATAAATGGAGTTTCCATTTATATTTACC
 TTTATTTCTTATTTACCATTGTCTTAGTAGATATTTACAAACATGACAGAAACACTAA
 ATCTTGAGTTTGAATGCACAGATATAAACACTTAACGGGTTTTAAAAATAATAATGT
 TGGTGAAAAAATATAACTTTGAGTGTAGCAGAGAGGAACCATTGCCACCTTCAGAT
 TTTCTGTAAACGATCGGGAACCTGGCATCTTCAGGGAGTAGCTTAGGTCAGTGAAGAG
 AAGAACA AAAAGCAGCATATTACAGTTAGTTGTCTTCATCAATCTTTAAATATGTTG
 TGTGGTTTTTCTCTCCCTGTTTCCACAGTTTTTCTTGATCATGAAAACGCCAACAAAA
 TTCTGAATCGGCCAAAGAGGTTTTCTTGATCATGAAAACGCCAACAAAAATTCTGAATC
 GGCCAAAGAGGTATAATTCAGGTAAATTGGAAGAGTTTGTTC AAGGGAACCTTGAG
 AGAGAATGTATGGAAGAAAAGTGTAGTTTTGAAGAAGCACGAGAAGTTTTTGAAAA
 CACTGAAAGAACAACCTGAATTTTGAAGCAGTATGTTGATGGAGATCAGTGTGAGT

CCAATCCATGTTTAAATGGCGGCAGTTGCAAGGATGACATTAATTCCTATGAATGTT
GGTGTCCCTTTGGATTTGAAGGAAAGAAGTGTGAATTAGATGTAACATGTAACATTA
AGAATGGCAGATGCGAGCAGTTTTGTAAAAATAGTGCTGATAACAAGGTGGTTTTGC
TCCTGTACTGAGGGATATCGACTTGCAGAAAACCAGAAGTCCTGTGAACCAGCAGT
GCCATTTCCATGTGGAAGAGTTTTCTGTTTCACAACTTCTAAGCTCACCCGTGCTGA
GACTGTTTTTCTGATGTGGACTATGTAAATTCTACTGAAGCTGAAACCATTTTGGAT
AACATCACTCAAAGCACCCAATCATTTAATGACTTCACTCGGGTTGTTGGTGGAGAA
GATGCCAAACCAGGTCAATTCCTTGGCAGGTTGTTTTGAATGGTAAAGTTGATGCA
TTCTGTGGAGGCTCTATCGTTAATGAAAAATGGATTGTAAGTCTGCCCCTGTGTT
GAAACTGGTGTAAAATTACAGTTGTCGCAGGTGAACATAATATTGAGGAGACAGA
ACATACAGAGCAAAAGCGAAATGTGATTTCGAATTATTCCTCACCACAACACTACAATG
CAGCTATTAATAAGTACAACCATGACATTGCCCTTCTGGAAGTGGACGAACCCTTAG
TGCTAAACAGCTACGTTACACCTATTTGCATTGCTGACAAGGAATACACGAACATCT
TCCTCAAATTTGGATCTGGCTATGTAAGTGGCTGGGGAAGAGTCTTCCACAAAGGGA
GATCAGCTTTAGTTCTTCAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTTGACCGAGCCACATGTCT
TCTATCTACAAAGTTCACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCTGGCTTCCATGAAGG
AGGTAGAGATTCATGTCAAGGAGATAGTGGGGGACCCCATGTTACTGAAGTGGAAAG
GGACCAGTTTCTTAACTGGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGTGTGCAATGAAAGGC
AAATATGGAATATATACCAAGGTATCCCGGTATGTCAACTGGATTAAGGAAAAAAC
AAAGCTCACTTAACCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCT
CCCCCGTGCCTTCTTACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTTCTAATAAAA
TGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGT
GGGGCAGGACAGCAAGGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGAT
GCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTA
TCCCCGTGAGATCGCCCATCGGTATAATGATTTGGGAGAACAACATTTCAAAGGCCT
GTAAGTTATAATGCTGAAAGCCCACTTAATATTTCTGGTAGTATTAGTTAAAGTTTT
AAAACACCTTTTTCCACCTTGAGTGTGAGAATTGTAGAGCAGTGCTGTCCAGTAGAA
ATGTGTGCATTGACAGAAAGACTGTGGATCTGTGCTGAGCAATGTGGCAGCCAGAG
ATCACAAGGCTATCAAGCACTTTGCACATGGCAAGTGTAACTGAGAAGCACACATT
CAAATAATAGTTAATTTAATTGAATGTATCTAGCCATGTGTGGCTAGTAGCTCCTTT
CCTGGAGAGAGAATCTGGAGCCACATCTAACTTGTTAAGTCTGGAATCTTATTTTT
TATTTCTGGAAAGGTCTATGAACTATAGTTTTGGGGGCAGCTCACTTACTAACTTTTA
ATGCAATAAGAATCTCATGGTATCTTGAGAACATTATTTTGTCTCTTTGTAGATCTAG
GAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAG
GCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAG
CGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA

Полная последовательность P00354 (от ИКП до ИКП): (SEQ ID NO: 284)

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAA
GGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
GAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTAGATCTTAGCCTCTGGCAA

ATGAAGTGGGTAACCTTTCTCCTCCTCCTCTTCGTCTCCGGCTCTGCTTTTTCCAGGG
GTGTGTTTCGCCGAGAAGCACGTAAGAGTTTTATGTTTTTTCATCTCTGCTTGTATTT
TTCTAGTAATGGAAGCCTGGTATTTTAAAATAGTTAAATTTTCCTTTAGTGCTGATTT
CTAGATTATTACTGTTGTTGTTGTTATTATTGTCATTATTTGCATCTGAGAACCCT
TAGGTGGTTATATTATTGATATATTTTTGGTATCTTTGATGACAATAATGGGGGATTT
TGAAAGCTTAGCTTTAAATTTCTTTTAATTAATAAAAAAAAAATGCTAGGCAGAATGACTC
AAATTACGTTGGATACAGTTGAATTTATTACGGTCTCATAGGGCCTGCCTGCTCGAC
CATGCTATACTAAAAATTAAGTGTGTGTTACTAATTTTATAAATGGAGTTTCCAT
TTATATTTACCTTTATTTCTTATTTACCATTGTCTTAGTAGATATTTACAAACATGAC
AGAAACACTAAATCTTGAGTTTGAATGCACAGATATAAAACACTTAACGGGTTTTAAA
ATAATAATGTTGGTGAAAAATATAACTTTGAGTGTAGCAGAGAGGAACCATTGC
CACCTTCAGATTTTCCTGTAACGATCGGGAACCTGGCATCTTCAGGGAGTAGCTTAGG
TCAGTGAAGAGAAGAACA AAAAGCAGCATATTACAGTTAGTTGTCTTCATCAATCTT
TAAATATGTTGTGTGGTTTTTCTCCTCCTGTTTCCACAGTTTTTCTTGATCATGAAAA
CGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAATTCAGGTAAATTGGAAGAGT
TTGTTCAAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAGTGTAGTTTTGAAGAA
GCACGAGAAGTTTTTGAAAACACTGAAAGAACA ACTGAATTTTGAAGCAGTATGT
TGATGGAGATCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTTAAATGGCGGCAGTTGCAAGGATG
ACATTAATTCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTTGAAGGAAAGA ACTGTGAAT
TAGATGTAACATGTAACATTAAGAATGGCAGATGCGAGCAGTTTTGTAAAAATAGT
GCTGATAACAAGGTGGTTTGCTCCTGTACTGAGGGATATCGACTTGCAGAAAACCA
GAAGTCCTGTGAACCAGCAGTGCCATTTCCATGTGGAAGAGTTTCTGTTTCACAAAC
TTCTAAGCTCACCCGTGCTGAGACTGTTTTTTCCTGATGTGGACTATGTAAATTCTACT
GAAGCTGAAACCATTTTGGATAACATCACTCAAAGCACCCAATCATTTAATGACTTC
ACTCGGGTTGTTGGTGGAGAAAGATGCCAAACCAGGTCAATTCCTTGGCAGGTTGTT
TTGAATGGTAAAGTTGATGCATTCTGTGGAGGCTCTATCGTTAATGAAAAATGGATT
GTA ACTGCTGCCACTGTGTTGAAACTGGTGTAAAATTACAGTTGTCGCAGGTGAA
CATAATATTGAGGAGACAGAACATACAGAGCAAAAAGCGAAATGTGATT CGAATTAT
TCCTCACCACA ACTACAATGCAGCTATTAATAAGTACAACCATGACATTGCCCTTCT
GGAACTGGACGAACCCTTAGTGCTAAACAGCTACGTTACACCTATTTGCATTGCTGA
CAAGGAATACACGAACATCTTCCTCAAATTTGGATCTGGCTATGTAAGTGGCTGGGG
AAGAGTCTTCCACAAAGGGAGATCAGCTTTAGTTCTTCAGTACCTTAGAGTTCCACT
TGTTGACCGAGCCACATGTCTTCTATCTACAAAGTTCACCATCTATAACAACATGTT
CTGTGCTGGCTTCCATGAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAAGGAGATAGTGGGGGAC
CCCATGTTACTGAAGTGAAGGGACCAGTTTCTTAACTGGAATTATTAGCTGGGGTG
AAGAGTGTGCAATGAAAGGCAAATATGGAATATATACCAAGGTATCCCGGTATGTC
AACTGGATTAAGGAAAAACAAAGCTCACTTAACCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCC
AGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCC
CACTGTCCTTTCCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCA
TTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGAC

AATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAAC
 CAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCGTGAGATCGCCCATCGGTATAATGATTTGGG
 AGAACAACATTTCAAAGGCCTGTAAGTTATAATGCTGAAAGCCCCTTAATATTTCT
 GGTAGTATTAGTTAAAGTTTTAAAACACCTTTTTCCACCTTGAGTGTGAGAATTGTA
 GAGCAGTGCTGTCCAGTAGAAATGTGTGCATTGACAGAAAGACTGTGGATCTGTGC
 TGAGCAATGTGGCAGCCAGAGATCACAAGGCTATCAAGCACTTTGCACATGGCAAG
 TGTAAGTGAAGAAGCACACATTCAAATAATAGTTAATTTTAATTGAATGTATCTAGCC
 ATGTGTGGCTAGTAGCTCCTTTCCTGGAGAGAGAATCTGGAGCCCACATCTAACTTG
 TTAAGTCTGGAATCTTATTTTTTATTTCTGGAAAGGTCTATGAACTATAGTTTTGGGG
 GCAGCTCACTTACTAACTTTTAATGCAATAAGAATCTCATGGTATCTTGAGAACATT
 ATTTTGTCTCTTTGTAGTACTGAAACCTTATACATGTGAAGTAAGGGGTCTATACTTA
 AGTCACATCTCCAACCTTAGTAATGTTTTAATGTAGTAAAAAATGAGTAATTAATT
 TATTTTTAGAAGGTCAATAGTATCATGTATTCAAATAACAGAGGTATATGGTTAGA
 AAAGAAACAATTCAAAGGACTTATATAATATCTAGCCTTGACAATGAATAAATTTA
 GAGAGTAGTTTGCCTGTTTGCCTCATGTTCATAAATCTATTGACACATATGTGCATCT
 GCACTTCAGCATGGTAGAAGTCCATATTCAGATCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTT
 GGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGG
 GCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGG
 GAGTGGCCAA

P00350: 300/600 п. о. конструкция НА F9 (для G551) (SEQ ID NO: 285)

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAA
 GGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
 GAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCTAGATCTAAGTATATTAGAGC
 GAGTCTTTCTGCACACAGATCACCTTTCCTATCAACCCCACTAGCCTCTGGCAAAAT
 GAAGTGGGTAACCTTCTCCTCCTCCTCTTCGTCTCCGGCTCTGCTTTTTCCAGGGGT
 GTGTTTCGCCGAGAAGCACGTAAGAGTTTTATGTTTTTTCATCTCTGCTTGTATTTTT
 CTAGTAATGGAAGCCTGGTATTTTAAAATAGTTAAATTTTCCTTTAGTGCTGATTTCT
 AGATTATTACTGTTGTTGTTGTTATTATTGTCATTATTTGCATCTGAGAACCTTTT
 TCTTGATCATGAAAACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAATTCAG
 GTAAATTGGAAGAGTTTGTTC AAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAG
 TGTAGTTTTGAAGAAGCACGAGAAGTTTTTGAAAACACTGAAAGAACAACCTGAATT
 TTGGAAGCAGTATGTTGATGGAGATCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTTAAATGGCGG
 CAGTTGCAAGGATGACATTAATTCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTTGAAGG
 AAAGAACTGTGAATTAGATGTAACATGTAACATTAAGAATGGCAGATGCGAGCAGT
 TTTGTA AAAAATAGTGCTGATAACAAGGTGGTTTGTCTCCTGTA CTGAGGGATATCGAC
 TTGCAGAAAACCAGAAGTCCTGTGAACCAGCAGTGCCATTTCCATGTGGAAGAGTTT
 CTGTTTCACAAACTTCTAAGCTCACCCGTGCTGAGACTGTTTTTTCCTGATGTGGACTA
 TGTA AATTCTACTGAAGCTGAAACCATTTTGGATAACATCACTCAAAGCACCCAATC
 ATTTAATGACTTCACTCGGGTTGTTGGTGGAGAAGATGCCAAACCAGGTCAATCCC
 TTGGCAGGTTGTTTTGAATGGTAAAGTTGATGCATTCTGTGGAGGCTCTATCGTTAA

TGAAAAATGGATTGTAACCTGCTGCCACTGTGTTGAAACTGGTGTAAAATTACAGT
 TGTCGCAGGTGAACATAATATTGAGGAGACAGAACATACAGAGCAAAAGCGAAAT
 GTGATTCTGAATTATTCCTCACCACAACCTACAATGCAGCTATTAATAAGTACAACCAT
 GACATTGCCCTTCTGGAACCTGGACGAACCCTTAGTGCTAAACAGCTACGTTACACCT
 ATTTGCATTGCTGACAAGGAATACACGAACATCTTCCTCAAATTTGGATCTGGCTAT
 GTAAGTGGCTGGGGAAGAGTCTTCCACAAAGGGAGATCAGCTTTAGTTCTTCAGTAC
 CTTAGAGTTCCACTTGTGACCGAGCCACATGTCTTCTATCTACAAAGTTCACCATCT
 ATAACAACATGTTCTGTGCTGGCTTCCATGAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAAGGA
 GATAGTGGGGGACCCCATGTTACTGAAGTGGAAAGGGACCAGTTTCTTAACTGGAAT
 TATTAGCTGGGGTGAAGAGTGTGCAATGAAAGGCAAATATGGAATATATACCAAGG
 TATCCCGGTATGTCAACTGGATTAAGGAAAAACAAAGCTCACTTAACTCGACTGT
 GCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTG
 GAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGT
 CTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGA
 GGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTG
 AGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCCTTAGGTGGTTATATTA
 TTGATATATTTTTGGTATCTTTGATGACAATAATGGGGGATTTTGAAAGCTTAGCTTT
 AAATTTCTTTTAATTAATAAAAAAATGCTAGGCAGAATGACTCAAATTACGTTGGATA
 CAGTTGAATTTATTACGGTCTCATAGGGCCTGCCTGCTCGACCATGCTATACTAAAA
 ATTAAGAGTGTGTGTTACTAATTTTATAAATGGAGTTTCCATTTATATTTACCTTTAT
 TTCTTATTTACCATTGTCTTAGTAGATATTTACAAACATGACAGAAACACTAAAGAT
 CTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC
 TGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCCGGGCGACCTTTGGTCCGCCGGCCTCAG
 TGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA

P00356: 300/2000 п. о. конструкция НА F9 (для G551) (SEQ ID NO: 286)

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAA
 GGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
 GAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCCTAGATCTAAGTATATTAGAGC
 GAGTCTTTCTGCACACAGATCACCTTTCCTATCAACCCCACTAGCCTCTGGCAAAT
 GAAGTGGGTAACTTTCTCCTCCTCCTCTTCGTCTCCGGCTCTGCTTTTTCCAGGGGT
 GTGTTTCGCCGAGAAGCACGTAAGAGTTTTATGTTTTTTCATCTCTGCTTGTATTTTT
 CTAGTAATGGAAGCCTGGTATTTTAAAATAGTTAAATTTTCCTTTAGTGCTGATTTCT
 AGATTATTACTGTTGTTGTTGTTATTATTGTCATTATTTGCATCTGAGAACCCTTTT
 TCTTGATCATGAAAACGCCAACAATAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAATTCAG
 GTAAATTGGAAGAGTTTGTCAAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAG
 TGTAGTTTTGAAGAAGCACGAGAAGTTTTTGAACAACACTGAAAGAACAACCTGAATT
 TTGGAAGCAGTATGTTGATGGAGATCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTTAAATGGCGG
 CAGTTGCAAGGATGACATTAATTCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTTGAAGG
 AAAGAACTGTGAATTAGATGTAACATGTAACATTAAGAATGGCAGATGCGAGCAGT
 TTTGTAAAAATAGTGCTGATAACAAGGTGGTTTGCTCCTGTAAGGGATATCGAC

TTGCAGAAAACCAGAAGTCCTGTGAACCAGCAGTGCCATTTCCATGTGGAAGAGTTT
CTGTTTCACAACTTCTAAGCTCACCCGTGCTGAGACTGTTTTTCTGATGTGGACTA
TGTA AATTCTACTGAAGCTGAAACCATTTTGGATAACATCACTCAAAGCACCCAATC
ATTTAATGACTTCACTCGGGTTGTTGGTGGAGAAGATGCCAAACCAGGTCAATTCCC
TTGGCAGGTTGTTTTGAATGGTAAAGTTGATGCATTCTGTGGAGGCTCTATCGTTAA
TGAAAAATGGATTGTA ACTGCTGCCACTGTGTTGAAACTGGTGTAAAATTACAGT
TGTCGCAGGTGAACATAATATTGAGGAGACAGAACATAACAGAGCAAAGCGAAAT
GTGATTCGAATTATTCCTCACCACA ACTACAATGCAGCTATTAATAAGTACAACCAT
GACATTGCCCTTCTGGA ACTGGACGAACCCTTAGTGCTAAACAGCTACGTTACACCT
ATTTGCATTGCTGACAAGGAATACACGAACATCTTCCTCAAATTTGGATCTGGCTAT
GTAAGTGGCTGGGGAAAGAGTCTTCCACAAAGGGAGATCAGCTTTAGTTCTTCAGTAC
CTTAGAGTTCCACTTGTGACCGAGCCACATGTCTTCTATCTACAAAGTTCACCATCT
ATAACAACATGTTCTGTGCTGGCTTCCATGAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAAGGA
GATAGTGGGGGACCCCATGTTACTGAAGTGGAAAGGGACCAGTTTCTTAACTGGAAT
TATTAGCTGGGGTGAAGAGTGTGCAATGAAAGGCAAATATGGAATATATACCAAGG
TATCCCGGTATGTCAACTGGATTAAGGAAAAACAAAGCTCACTTAACCTCGACTGT
GCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTG
GAAGGTGCCACTCCC ACTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGT
CTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGA
GGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTG
AGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCCTTAGGTGGTTATATTA
TTGATATATTTTTGGTATCTTTGATGACAATAATGGGGGATTTTGAAAGCTTAGCTTT
AAATTTCTTTTAATTA AAAAAAAAAAATGCTAGGCAGAATGACTCAAATTACGTTGGATA
CAGTTGAATTTATTACGGTCTCATAGGGCCTGCCTGCTCGACCATGCTATACTAAAA
ATTA AAAAGTGTGTGTTACTAATTTTATAAATGGAGTTTCCATTTATATTTACCTTTAT
TTCTTATTTACCATTGTCTTAGTAGATATTTACAAACATGACAGAAACACTAAATCTT
GAGTTTGAATGCACAGATATAAACACTTAACGGGTTTTTAAAAATAATAATGTTGGTG
AAAAAATATAACTTTGAGTGTAGCAGAGAGGAACCATTGCCACCTTCAGATTTTCTT
GTAACGATCGGGA ACTGGCATCTTCAGGGAGTAGCTTAGGTCAAGAGAGAAGAA
CAAAAAGCAGCATATTACAGTTAGTTGTCTTCATCAATCTTTAAATATGTTGTGTGG
TTTTTCTCTCCCTGTTTCCACAGACAAGAGTGAGATCGCCCATCGGTATAATGATTTG
GGAGAACAACATTTCAAAGGCCTGTAAGTTATAATGCTGAAAGCCCACTTAATATTT
CTGGTAGTATTAGTTAAAGTTTTTAAAACACCTTTTTTCCACCTTGAGTGTGAGAATTGT
AGAGCAGTGCTGTCCAGTAGAAATGTGTGCATTGACAGAAAGACTGTGGATCTGTG
CTGAGCAATGTGGCAGCCAGAGATCACAAGGCTATCAAGCACTTTGCACATGGCAA
GTGTA ACTGAGAAGCACACATTCAAATAATAGTTAATTTTAATTGAATGTATCTAGC
CATGTGTGGCTAGTAGCTCCTTTCCTGGAGAGAGAATCTGGAGCCCACATCTAACTT
GTTAAGTCTGGAATCTTATTTTTTATTTCTGGAAAGGTCTATGAACTATAGTTTTGGG
GGCAGCTCACTTACTAACTTTTAAATGCAATAAGATCCATGGTATCTTGAGAACATTA
TTTTGTCTCTTTGTAGTACTGAAACCTTATACATGTGAAGTAAGGGGTCTATACTTAA

GTCACATCTCCAACCTTAGTAATGTTTTAATGTAGTAAAAAATGAGTAATTAATTT
ATTTTTAGAAGGTCAATAGTATCATGTATTCCAAATAACAGAGGTATATGGTTAGAA
AAGAAACAATTCAAAGGACTTATATAATATCTAGCCTTGACAATGAATAAATTTAG
AGAGTAGTTTGCCTGTTTGCCTCATGTTCATAAATCTATTGACACATATGTGCATCTG
CACTTCAGCATGGTAGAAGTCCATATTCCTTTGCTTGGAAGGCAGGTGTTCCCATTT
ACGCCTCAGAGAATAGCTGACGGGAAGAGGCTTTCTAGATAGTTGTATGAAAGATA
TACAAAATCTCGCAGGTATACACAGGCATGATTTGCTGGTTGGGAGAGCCACTTGCC
TCATACTGAGGTTTTTGTGTCTGCTTTTCAGAGTCCTGATTGCCTTTTCCCAGTATCTC
CAGAAATGCTCATAACGATGAGCATGCCAAATTAGTGCAGGAAGTAACAGACTTTGC
AAAGACGTGTGTTGCCGATGAGTCTGCCGCCAACTGTGACAAATCCCTTGTGAGTAC
CTTCTGATTTTGTGGATCTACTTTCCTGCTTTCTGGAACCTCTGTTTCAAAGCCAATCA
TGACTCCATCACTTAAGGCCCGGGAACACTGTGGCAGAGGGCAGCAGAGAGATTG
ATAAAGCCAGGGTGATGGGAATTTTCTGTGGGACTCCATTTCATAGTAATTGCAGAA
GCTACAATACTCAAAAAGTCTCACCACATGACTGCCCAAATGGGAGCTTGACAG
TGACAGTGACAGTAGATATGCCAAAGTGGATGAGGGAAAGACCACAAGAGCTAAA
CCCTGTAAAAAGAACTGTAGGCAACTAAGGAATGCAGAGAGAAAGATCTAGGAAC
CCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCG
CCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAG
CGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA

P00362: 300/1500 п. о. конструкция НА F9 (для G551) (SEQ ID NO: 287)

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAA
GGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
GAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCTAGATCTAAGTATATTAGAGC
GAGTCTTTCTGCACACAGATCACCTTTCCTATCAACCCCACTAGCCTCTGGCAAAT
GAAGTGGGTAACCTTTCCTCCTCCTCTTCGTCTCCGGCTCTGCTTTTTCCAGGGGT
GTGTTTCGCCGAGAAGCACGTAAGAGTTTTATGTTTTTTCATCTCTGCTTGTATTTTT
CTAGTAATGGAAGCCTGGTATTTTAAAATAGTTAAATTTTCCTTTAGTGCTGATTTCT
AGATTATTACTGTTGTTGTTGTTATTATTGTCATTATTTGCATCTGAGAACCTTTT
TCTTGATCATGAAAACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAATTCAG
GTAAATTGGAAGAGTTTGTTC AAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAG
TGTAGTTTTGAAGAAGCACGAGAAGTTTTTGAAAACACTGAAAGAACAACCTGAATT
TTGGAAGCAGTATGTTGATGGAGATCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTTAAATGGCGG
CAGTTGCAAGGATGACATTAATTCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTTGAAGG
AAAGAACTGTGAATTAGATGTAACATGTAACATTAAGAATGGCAGATGCGAGCAGT
TTTGTA AAAAATAGTGCTGATAACAAGGTGGTTTGTCTCCTGTACTGAGGGATATCGAC
TTGCAGAAAACCAGAAGTCCTGTGAACCAGCAGTGCCATTTCCATGTGGAAGAGTTT
CTGTTTCACAAACTTCTAAGCTCACCCGTGCTGAGACTGTTTTTTCCTGATGTGGACTA
TGTA AATTCTACTGAAGCTGAAACCATTTTGGATAACATCACTCAAAGCACCCAATC
ATTTAATGACTTCACTCGGGTTGTTGGTGGAGAAGATGCCAAACCAGGTCAATTTCC
TTGGCAGGTTGTTTTGAATGGTAAAGTTGATGCATTCTGTGGAGGCTCTATCGTTAA

TGAAAAATGGATTGTAAC TGCTGCCACTGTGTTGAAACTGGTGT TAAAATTACAGT
TGTCGCAGGTGAACATAATATTGAGGAGACAGAACATA CAGAGCAAAGCGAAAT
GTGATT CGAATTATTCCTCACCACA ACTACAATGCAGCTATTAATAAGTACAACCAT
GACATTGCCCTTCTGGA ACTGGACGAACCCTTAGTGCTAAACAGCTACGTTACACCT
ATTTGCATTGCTGACAAGGAATACACGAACATCTTCCTCAAATTTGGATCTGGCTAT
GTAAGTGGCTGGGGAAGAGTCTTCCACAAAGGGAGATCAGCTTTAGTTCTTCAGTAC
CTTAGAGTTCCACTTGTTGACCGAGCCACATGTCTTCTATCTACAAAGTTCACCATCT
ATAACAACATGTTCTGTGCTGGCTTCATGAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAAGGA
GATAGTGGGGGACCCCATGTTACTGAAGTGGAAAGGGACCAGTTTCTTAACTGGAAT
TATTAGCTGGGGTGAAGAGTGTGCAATGAAAGGCAAATATGGAATATATACCAAGG
TATCCCGGTATGTCAACTGGATTAAGGAAAAAACAAAGCTCACTTAACTCGACTGT
GCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTG
GAAGGTGCCACTCCC ACTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGT
CTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGA
GGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTG
AGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCCTTAGGTGGTTATATTA
TTGATATATTTTTGGTATCTTTGATGACAATAATGGGGGATTTTGAAAGCTTAGCTTT
AAATTTCTTTTAATTA AAAAAAAAAATGCTAGGCAGAATGACTCAAATTACGTTGGATA
CAGTTGAATTTATTACGGTCTCATAGGGCCTGCCTGCTCGACCATGCTATACTAAAA
ATTA AAAAGTGTGTGTTACTAATTTTATAAATGGAGTTTCCATTTATATTTACCTTTAT
TTCTTATTTACCATTGTCTTAGTAGATATTTACAAACATGACAGAAACACTAAATCTT
GAGTTTGAATGCACAGATATAAACACTTAACGGGTTTTTAAAAATAATAATGTTGGTG
AAAAAATATAACTTTGAGTGTAGCAGAGAGGAACCATTGCCACCTTCAGATTTTCCT
GTAACGATCGGGA ACTGGCATCTTCAGGGAGTAGCTTAGGTCAGTGAAGAGAAGAA
CAAAAAGCAGCATATTACAGTTAGTTGTCTTCATCAATCTTTAAATATGTTGTGTGG
TTTTTCTCTCCCTGTTTCCACAGACAAGAGTGAGATCGCCCATCGGTATAATGATTTG
GGAGAACAACATTTCAAAGGCCTGTAAGTTATAATGCTGAAAGCCCACTTAATATTT
CTGGTAGTATTAGTTAAAGTTTTAAAACACCTTTTTCCACCTTGAGTGTGAGAATTGT
AGAGCAGTGCTGTCCAGTAGAAATGTGTGCATTGACAGAAAGACTGTGGATCTGTG
CTGAGCAATGTGGCAGCCAGAGATCACAAGGCTATCAAGCACTTTGCACATGGCAA
GTGTA ACTGAGAAGCACACATTCAAATAATAGTTAATTTTAATTGAATGTATCTAGC
CATGTGTGGCTAGTAGCTCCTTTCCCTGGAGAGAGAATCTGGAGCCCACATCTAACTT
GTAAAGTCTGGAATCTTATTTTTTTATTTCTGGAAAGGTCTATGAACTATAGTTTTGGG
GGCAGCTCACTTACTA ACTTTTAATGCAATAAGATCCATGGTATCTTGAGAACATTA
TTTTGTCTCTTTGTAGTACTGAAACCTTATACATGTGAAGTAAGGGGTCTATACTTAA
GTCACATCTCCAACCTTAGTAATGTTTTAATGTAGTAAAAAATGAGTAATTAATTT
ATTTTTAGAAGGTCAATAGTATCATGTATTCCAAATAACAGAGGTATATGGTTAGAA
AAGAAACAATTCAAAGGACTTATATAATATCTAGCCTTGACAATGAATAAATTTAG
AGAGTAGTTTGCCTGTTTGCCTCATGTTTCATAAATCTATTGACACATATGTGCATCTG
CACTTCAGCATGGTAGAAGTCCATATTCCTTTGCTTGGAAGGCAGGTGTTCCCAT

ACGCCTCAGAGAATAGCTGACGGGAAGAGGCTTTCTAGATAGTTGTATGAAAGATA
 TACAAAATCTCGCAGGTATACACAGGCATGATTTGCTGGTTGGGAGAGCCACTTAG
 ATCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTC
 ACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTC
 AGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA

Полипептид фактора IX R338L, кодируемый в P00147 (SEQ ID NO: 702)

YNSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESN
 PCLNGGSKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTE
 GYRLAENQKSCPEAVPFPCGRVSVSQTSLKTRAETVFPDVDYVNSTEAEITLDNITQSTQ
 SFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITV
 VAGEHNIEETEHTEQKRN VIRIIPHNNYNAANKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAD
 KEYTNIFLKFSGYVSWGGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCA
 GFHEGGRDSCQGDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIIYTKVSRVYVNWIKE
 KTKLT

OPC Cas9 (SEQ ID NO: 703)

ATGGATAAGAAGTACTCAATCGGGCTGGATATCGGAACTAATTCCGTGGGTT
 GGGCAGTGATCACGGATGAATACAAAGTGCCGTCCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGG
 AACACCGATAGACACAGCATCAAGAAAATCTCATCGGAGCCCTGCTGTTTGACTC
 CGGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCTCAAACGTACCGCGAGGGCGACGCTACACCC
 GGCGGAAGAATCGCATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTTTCGAACGAAATGGCAAAG
 GTCGACGACAGCTTCTTCCACCGCCTGGAAGAATCTTTCCTGGTGGAGGAGGACAA
 GAAGCATGAACGGCATCCTATCTTTGGAAACATCGTCGACGAAGTGGCGTACCACG
 AAAAGTACCCGACCATCTACCATCTGCGGAAGAAGTTGGTTGACTCAACTGACAAG
 GCCGACCTCAGATTGATCTACTTGGCCCTCGCCATATGATCAAATTCCGCGGACAC
 TTCCTGATCGAAGGCGATCTGAACCCTGATAACTCCGACGTGGATAAGCTTTTCATT
 CAACTGGTGCAGACCTACAACCAACTGTTCGAAGAAAACCCAATCAATGCTAGCGG
 CGTCGATGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTCGAAGTCGCGGGCGCCTCGAAA
 ACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAGAAAAAGAACGGACTTTTCGGCAACTTGATC
 GCTCTCTCACTGGGACTCACTCCCAATTTCAAGTCCAATTTTGACCTGGCCGAGGAC
 GCGAAGCTGCAACTCTCAAAGGACACCTACGACGACGACTTGGACAATTTGCTGGC
 ACAAATTGGCGATCAGTACGCGGATCTGTTCCCTTGCCGCTAAGAACCTTTCGGACGC
 AATCTTGCTGTCCGATATCCTGCGCGTGAACACCGAAATAACCAAAGCGCCGCTTAG
 CGCCTCGATGATTAAGCGGTACGACGAGCATCACCAGGATCTCACGCTGCTCAAAG
 CGCTCGTGAGACAGCAACTGCCTGAAAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCC
 AAGAATGGGTACGCAGGGTACATCGATGGAGGGCGCTAGCCAGGAAGAGTTCTATAA
 GTTCATCAAGCCAATCCTGGAAAAGATGGACGGAACCGAAGAAGTCTGGTCAAGC
 TGAACAGGGAGGATCTGCTCCGGAAAACAGAGAACCCTTTGACAACGGATCCATTTCC
 CACCAGATCCATCTGGGTGAGCTGCACGCCATCTTGCGGGCGCCAGGAGGACTTTTAC
 CCATTCCTCAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAAATTCTGACGTTCCGCATCCC
 GTATTACGTGGGCCCACTGGCGCGCGGCAATTCGCGCTTCGCGTGGATGACTAGAA

AATCAGAGGAAACCATCACTCCTTGGAAATTTTCGAGGAAGTTGTGGATAAGGGAGCT
TCGGCACAAAGCTTCATCGAACGAATGACCAACTTCGACAAGAATCTCCCAAACGA
GAAGGTGCTTCTAAGCACAGCCTCCTTTACGAATACTTCACTGTCTACAACGAACT
GACTAAAGTGAAATACGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGCCTTTCTGTCCGGAG
AACAGAAGAAAGCAATTGTTCGATCTGCTGTTCAAGACCAACCGCAAGGTGACCGTC
AAGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGTTTCGACTCAGTGGAAAT
CAGCGGGGTGGAGGACAGATTCAACGCTTCGCTGGGAACCTATCATGATCTCCTGA
AGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTTGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAA
GATATCGTCCTGACCTTGACCCTTTTCGAGGATCGCGAGATGATCGAGGAGAGGCTT
AAGACCTACGCTCATCTCTTCGACGATAAGGTCATGAAACAACCTCAAGCGCCGCCG
GTACACTGGTTGGGGCCGCCTCTCCCGCAAGCTGATCAACGGTATTCGCGATAAACA
GAGCGGTAAAACTATCCTGGATTTCTCAAATCGGATGGCTTCGCTAATCGTAACTT
CATGCAATTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAGGAGGACATCCAAAAGCAC
AAGTGTCCGGACAGGGAGACTCACTCCATGAACACATCGCGAATCTGGCCGGTTCG
CCGGCGATTAAGAAGGGAATTCTGCAAACGTGTAAGGTGGTTCGACGAGCTGGTGAA
GGTCATGGGACGGCACAACCGGAGAATATCGTGATTGAAATGGCCCGAGAAAACC
AGACTACCCAGAAGGGCCAGAAAACCTCCCGCGAAAGGATGAAGCGGATCGAAGA
AGGAATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCACCCGGTGGAAAACACG
CAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTACCTGTACTATTTGCAAATGGACGGGACATGTA
CGTGGACCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTGTCTGATTACGACGTGGACCACATCGT
TCCACAGTCCTTTCTGAAGGATGACTCGATCGATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGA
CAAGAACAGAGGGAAGTCAGATAATGTGCCATCGGAGGAGGTCGTGAAGAAGATG
AAGAATTACTGGCGGCAGCTCCTGAATGCGAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTGA
CAATCTCACTAAAGCCGAGCGCGGCGGACTCTCAGAGCTGGATAAGGCTGGATTCA
TCAAACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCAGATTACCAAGCACGTGGCGCAGATCTTG
GACTCCCGCATGAACACTAAATACGACGAGAACGATAAGCTCATCCGGGAAGTGAA
GGTGATTACCCTGAAAAGCAAACCTTGTGTTCGGACTTTTCGGAAGGACTTTCAGTTTTA
CAAAGTGAGAGAAATCAACAACCTACCATCACGCGCATGACGCATACCTCAACGCTG
TGGTCGGTACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAACTTGAATCGGAGTTTGTGTACG
GAGACTACAAGGTCTACGACGTGAGGAAGATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAATC
GGGAAAGCAAACCTGCGAAATACTTCTTTTACTCAAACATCATGAACTTTTTCAAGACT
GAAATTACGCTGGCCAATGGAGAAATCAGGAAGAGGCCACTGATCGAAACTAACGG
AGAAACGGGCGAAATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGACTTCGCAACTGTTTCGCAAAG
TGCTCTCTATGCCGCAAGTCAATATTGTGAAGAAAACCGAAGTGCAAACCGGCGGA
TTTTCAAAGGAATCGATCCTCCCAAAGAGAAATAGCGACAAGCTCATTGCACGCAA
GAAAGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGATTCGCCGACTGTTCGCATACT
CCGTCCTCGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGAAAGAGCAAAAAGCTCAAATCCGTC
AAAGAGCTGCTGGGGATTACCATCATGGAACGATCCTCGTTCGAGAAGAACCCGAT
TGATTTCTTCGAGGGCGAAGGGTTACAAGGAGGTGAAGAAGGATCTGATCATCAAAC
TCCCAAGTACTCACTGTTTCGAACTGGAAAATGGTCGGAAGCGCATGCTGGCTTCGG

CCGGAGAACTCCAAAAAGGAAATGAGCTGGCCTTGCCTAGCAAGTACGTCAACTTC
CTCTATCTTGCTTCGCACTACGAAAACTCAAAGGGTCACCGGAAGATAACGAACA
GAAGCAGCTTTTCGTGGAGCAGCACAAGCATTATCTGGATGAAATCATCGAACAAA
TCTCCGAGTTTTCAAAGCGCGTGATCCTCGCCGACGCCAACCTCGACAAAGTCCTGT
CGGCCTACAATAAGCATAGAGATAAGCCGATCAGAGAACAGGCCGAGAACATTATC
CACTTGTTACCCCTGACTAACCTGGGAGCCCCAGCCGCCTTCAAGTACTTCGATACT
ACTATCGATCGCAAAAGATACACGTCCACCAAGGAAGTTCTGGACGCGACCCTGAT
CCACCAAAGCATCACTGGACTCTACGAAACTAGGATCGATCTGTTCGCAGCTGGGTG
GCGAT

OPC U-dep Cas9 (SEQ ID NO: 704)

ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGA
TGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGG
AAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTTCGACA
GCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACAC
AAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAA
AGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCCTGGTCGAAGAAGAC
AAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCA
CGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACA
AGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGA
CACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTT
CATCCAGCTGGTCCAGACATAACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAA
GCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACT
GGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTTCGGAAAC
CTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGC
AGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAAC
CTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTTCCTGGCAGCAAAGAACCT
GAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGG
CACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACA
CTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTT
CGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAA
GAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAACT
GCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAAC
GGAAGCATCCCGCACCAAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACA
GGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGA
CATTGAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGCA
TGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACCTTCGAAGAAGTCG
TCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAAACTTCGACAAG
AACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCAC
AGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAAGCCG
GCATTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAA

CAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCT
TCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACA
TACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAA
CGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTTTCGAAGACAGAGAAA
TGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTCATGAAG
CAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCA
ACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGA
CGGATTCGCAAACAGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCA
AGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACA
CATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCA
AGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTC
ATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAG
AAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAA
GGAACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACC
TGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGC
GACTACGACGTCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGA
CAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGTCCCG
AGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAA
AGCTGATCACACAGAGAAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACT
GAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAG
ATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGA
AAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCA
GCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACCTACCAC
CACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTA
CCCGAAGCTGGAAAGCGAATTTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAA
AGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTC
TACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAAT
CAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGAC
AAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACAT
CGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCG
AAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGT
ACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTC
GAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAA
TCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGGA
TACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTTCGA
ACTGGAAAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGA
AACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTA
CGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTTCGTCGAA
CAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAG
AGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCACA

GAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTCCACTGACA
AACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAG
ATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACTGATCCACCAGAGCATCACAG
GACTGTACGAAACAAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAG
CCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAG

мРНК, содержащая U dep Cas9 (SEQ ID NO: 705)

GGGUCCCGCAGUCGGCGUCCAGCGGCUCUGCUUGUUCGUGUGUGUGUCGU
UGCAGGCCUUAUUCGGAUCCGCCACCAUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGA
CAUCGGAACAAACAGCGUCGGAUUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCG
AGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAAC
CUGAUCGGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUG
AAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUG
CAGGAAAUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACAGAC
UGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCU
UCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAUCUACCA
CCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUAC
CUGGCACUGGCACACAUGAUCAGUUCAGAGGACACUCCUGAUCGAAGGAGACC
UGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUA
CAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCA
AUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCACAGC
UGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGG
GACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCA
GCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGA
GACCAGUACGCAGACCUGUUCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGC
UGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAG
CAUGAUC AAGAGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUG
GUCAGACAGCAGCUGCCGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAG
AACGGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAG
UUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAG
CUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUC
CCGCACCAGA UCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGAAGACU
UCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGA UCCUGACA UUCA
GAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAU
GACAAGAAAGAGCGAAGAAACAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGA
CAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGACAAGAA
CCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACA
GUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCG
GCAUUCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACA
AACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAU CGAA
UGCUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGG

GAACAUACCACGACCUGCUGAAGAUAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGA
AGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGAC
AGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUAACGCACACCUGUUCGACGACAAG
GUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUUGGGGAAGACUGAGCAGA
AAGCUGAUAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUC
CUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACA
GCCUGACAUAUCAAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACA
GCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGGAAU
CCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAA
GCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGG
ACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACU
GGGAAGCCAGA UCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAA
AAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAAC
UGGACAUCAACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUU
CCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGA
GGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUAC
UGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUG
ACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAG
AGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCAACAAGCACGUCGCACAGAUCCUGGACA
GCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGG
UCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCAGUUCUA
CAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCA
GUCGUCGGAACAGCACUGAUAAGAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUC
UACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAG
GAAUUCGGAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUC
UUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUC
GAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCA
ACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAA
GUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGAC
AAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGAC
AGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGA
GCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAA
GCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAG
UCAAGAAGGACCUGAUAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAAA
ACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAAC
UGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAAAA
GCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCAC
AAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUC
AUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAG
ACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAA

CCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAAUCGACAGAAAGAGA
UACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAG
GACUGUACGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAA
GCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCUAGCUAGCCAUCACAUUUAAAAGCAUCUCAG
CCUACCAUGAGAAUAAGAGAAAGAAAAUGAAGAUCAAUAGCUUAUUCAUCUCUU
UUUCUUUUUCGUUGGUGUAAAGCCAACACCCUGUCUAAAAACAUAUUUCUU
UAAUCAUUUUGCCUCUUUCUCUGUGCUUCAAUAAUAAAAAUGGAAAGAACC
UCGAGAA
AAA

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ внесения нуклеиновой кислоты фактора IX в клетку или популяцию клеток, включающий введение

i) конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую белок фактора IX;

ii) РНК-направляемого ДНК-связывающего агента; и

iii) гидовой РНК (гРНК), содержащей последовательность, выбранную из:

a) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32 и 33;

b) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32 и 33;

c) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 и 97;

d) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33;

e) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33;

f) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-97;

g) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 98-119;

h) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 98-119; и

i) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 120-163; и

j) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO из таблицы 2, таблицы 7 и таблицы 8,

с внесением, таким образом, нуклеиновой кислоты фактора IX в клетку или популяцию клеток.

2. Способ экспрессии фактора IX в клетке или популяции клеток, включающий введение

i) конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую белок фактора IX;

ii) РНК-направляемого ДНК-связывающего агента; и

iii) гидовой РНК (гРНК), содержащей последовательность, выбранную из:

a) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32 и 33;

b) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32 и 33;

c) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 40, 45,

51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 и 97;

d) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33;

e) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33;

f) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-97;

g) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 98-119;

h) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 98-119; и

i) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 120-163;

l) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO из таблицы 2, таблицы 7 и таблицы 8,

с обеспечением, таким образом, экспрессии фактора IX в клетке или популяции клеток.

3. Способ по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что введение осуществляют *in vitro*.

4. Способ по любому одному из пп. 1-3, отличающийся тем, что гРНК содержит направляющую последовательность, содержащую последовательность, выбранную из

a) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33;

b) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33;

c) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 и 97;

d) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33;

e) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; и

f) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-97.

5. Способ по любому одному из пп. 1-4, отличающийся тем, что конструкцию нуклеиновой кислоты вводят в векторе нуклеиновой кислоты и/или липидной наночастице.

6. Способ по любому одному из пп. 1-5, отличающийся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas9 или нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9.

7. Способ по любому одному из пп. 1-6, отличающийся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

8. Способ по п. 7, отличающийся тем, что нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-

направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой мРНК.

9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что мРНК представляет собой модифицированную мРНК.

10. Способ по любому одному из пп. 1-9, отличающийся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент и/или гРНК вводят в векторе нуклеиновой кислоты и/или липидной наночастице.

11. Способ по любому одному из пп. 5-10, отличающийся тем, что вектор нуклеиновой кислоты представляет собой вирусный вектор.

12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что вирусный вектор выбран из группы, состоящей из аденоассоциированного вирусного вектора (AAV), аденовирусного вектора, ретровирусного вектора и лентивирусного вектора.

13. Способ по п. 12, отличающийся тем, что AAV-вектор выбран из группы, состоящей из AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV8, AAV-DJ и AAV2/8.

14. Способ по п. 13 или п. 14, отличающийся тем, что вирусный вектор представляет собой AAV-вектор.

15. Способ по любому одному из пп. 1-14, отличающийся тем, что конструкцию нуклеиновой кислоты, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент и гРНК вводят последовательно, в любом порядке и/или в любой комбинации.

16. Способ по любому одному из пп. 1-14, отличающийся тем, что конструкцию нуклеиновой кислоты, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент и гРНК, отдельно или в любой комбинации, вводят одновременно.

17. Способ по любому одному из пп. 1-16, отличающийся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или РНК-направляемый ДНК-связывающий агент и гРНК в комбинации вводят до введения конструкции нуклеиновой кислоты.

18. Способ по любому одному из пп. 1-17, отличающийся тем, что конструкцию нуклеиновой кислоты вводят до введения гРНК и/или РНК-направляемого ДНК-связывающего агента.

19. Способ по любому одному из пп. 1-18, отличающийся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas-нуклеазу.

20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что Cas-нуклеаза представляет собой Cas-нуклеазу класса 2.

21. Способ по п. 19 или п. 20, отличающийся тем, что Cas-нуклеаза представляет собой Cas9.

22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что Cas-нуклеаза представляет собой Cas9-нуклеазу *S. pyogenes*.

23. Способ по любому одному из пп. 19-22, отличающийся тем, что Cas-нуклеаза обладает сайт-специфической ДНК-связывающей активностью.

24. Способ по любому одному из пп. 19-23, отличающийся тем, что Cas-нуклеаза представляет собой никазу.

25. Способ по любому одному из пп. 19-23, отличающийся тем, что Cas-нуклеаза

представляет собой кливазу (cleavase).

26. Способ по любому одному из пп. 19-23, отличающийся тем, что Cas-нуклеаза не обладает активностью никазы или кливазы.

27. Способ по любому одному из пп. 1-26, отличающийся тем, что конструкция нуклеиновой кислоты представляет собой двунаправленную конструкцию нуклеиновой кислоты.

28. Способ по любому предшествующему пункту, отличающийся тем, что конструкция нуклеиновой кислоты представляет собой независимую от гомологии донорную конструкцию.

29. Способ по любому одному из пп. 1-28, отличающийся тем, что конструкция нуклеиновой кислоты является одноцепочечной или двухцепочечной.

30. Способ по любому одному из пп. 1-29, отличающийся тем, что конструкция нуклеиновой кислоты представляет собой одноцепочечную ДНК или двухцепочечную ДНК.

31. Способ по любому одному из пп. 1-30, отличающийся тем, что двунаправленная конструкция не содержит промотор, который управляет экспрессией белка фактора IX.

32. Способ по любому одному из пп. 1-31, отличающийся тем, что клетка или популяция клеток экспрессируют фактор IX с гетерологичным сигнальным пептидом.

33. Способ по п. 32, отличающийся тем, что клетка или популяция клеток экспрессируют фактор IX с сигнальным пептидом альбумина.

34. Способ по любому одному из пп. 1-33, отличающийся тем, что клетка или популяция клеток экспрессируют фактор IX с сигнальным пептидом фактора IX, необязательно, в комбинации с гетерологичным пептидом.

35. Способ по любому одному из пп. 1-34, отличающийся тем, что клетка или популяция клеток представляет собой или включают клетку печени.

36. Способ по п. 35, отличающийся тем, что клетка печени представляет собой гепатоцит.

37. Способ по любому одному из пп. 1-36, отличающийся тем, что нуклеиновая кислота кодирует белок фактора IX дикого типа.

38. Способ по любому одному из пп. 1-36, отличающийся тем, что нуклеиновая кислота кодирует мутантный белок фактора IX.

39. Способ по п. 38, отличающийся тем, что нуклеиновая кислота кодирует белок фактора IX, имеющий мутацию R338L.

40. Способ внесения нуклеиновой кислоты фактора IX в клетку или популяцию клеток, включающий введение в клетку или популяцию клеток двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую белок фактора IX, с обеспечением, таким образом, экспрессии фактора IX в клетке или популяции клеток.

41. Способ экспрессии фактора IX в клетке или популяции клеток, включающий

введение в клетку или популяцию клеток двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую белок фактора IX, с обеспечением, таким образом, экспрессии фактора IX в клетке или популяции клеток.

42. Способ по п. 40 или п. 41, отличающийся тем, что двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты содержит

а) первый сегмент, содержащий кодирующую последовательность фактора IX; и

б) второй сегмент, содержащий обратную комплементарную последовательность кодирующей последовательности фактора IX,

причем конструкция не содержит промотор, который управляет экспрессией белка фактора IX.

43. Способ по любому одному из пп. 27-42, отличающийся тем, что двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты содержит акцептор сплайсинга перед кодирующей последовательностью фактора IX.

44. Способ по любому одному из пп. 40-43, дополнительно включающий введение РНК-направляемого ДНК-связывающего агента, например в виде нуклеиновой кислоты, кодирующей РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

45. Способ по любому одному из пп. 40-44, дополнительно включающий введение гРНК.

46. Способ по любому одному из пп. 40-45, отличающийся тем, что двунаправленную конструкцию нуклеиновой кислоты вводят в векторе нуклеиновой кислоты и/или липидной наночастице.

47. Способ по любому одному из пп. 40-46, отличающийся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент вводят в векторе нуклеиновой кислоты и/или липидной наночастице.

48. Способ по любому одному из пп. 40-47, отличающийся тем, что гРНК вводят в векторе нуклеиновой кислоты и/или липидной наночастице.

49. Способ по любому одному из пп. 46-48, отличающийся тем, что вектор нуклеиновой кислоты представляет собой вирусный вектор.

50. Способ по п. 49, отличающийся тем, что вирусный вектор выбран из группы, состоящей из аденоассоциированного вирусного (AAV) вектора, аденовирусного вектора, ретровирусного вектора и лентивирусного вектора.

51. Способ по п. 50, отличающийся тем, что AAV-вектор выбран из группы, состоящей из AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV8, AAV-DJ и AAV2/8.

52. Способ по п. 50 или п. 51, отличающийся тем, что вирусный вектор представляет собой AAV-вектор.

53. Способ по любому одному из пп. 40-52, отличающийся тем, что двунаправленную конструкцию нуклеиновой кислоты, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент и гРНК вводят последовательно, в любом порядке и/или в любой комбинации.

54. Способ по любому одному из пп. 40-52, отличающийся тем, что

двунаправленную конструкцию нуклеиновой кислоты, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент и гРНК, в любой комбинации, вводят одновременно.

55. Способ по любому одному из пп. 40-53, отличающийся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или РНК-направляемый ДНК-связывающий агент и гРНК в комбинации вводят до введения двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты.

56. Способ по любому одному из пп. 40-53, отличающийся тем, что двунаправленную конструкцию нуклеиновой кислоты вводят до введения гРНК и/или РНК-направляемого ДНК-связывающего агента.

57. Способ по любому одному из пп. 40-56, отличающийся тем, что двунаправленную конструкцию нуклеиновой кислоты, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент и гРНК, в любой комбинации, вводят с интервалом не более часа.

58. Способ по любому одному из пп. 40-57, отличающийся тем, что двунаправленная конструкция не содержит промотор, который управляет экспрессией белка фактора IX.

59. Способ по любому одному из пп. 40-58, отличающийся тем, что двунаправленная конструкция является одноцепочечной или двухцепочечной.

60. Способ по любому одному из пп. 40-59, отличающийся тем, что конструкция нуклеиновой кислоты представляет собой одноцепочечную ДНК или двухцепочечную ДНК.

61. Способ по любому одному из пп. 40-60, отличающийся тем, что гРНК содержит по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33, или последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33.

62. Способ внесения нуклеиновой кислоты фактора IX в клетку или популяцию клеток, включающий введение

i) двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую белок фактора IX;

ii) РНК-направляемого ДНК-связывающего агента; и

iii) гидовой РНК (гРНК), содержащей последовательность, нацеленную на безопасный приемный локус,

с внесением, таким образом, нуклеиновой кислоты фактора IX в клетку или популяцию клеток.

63. Способ экспрессии фактора IX в клетке или популяции клеток, включающий введение

i) двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую белок фактора IX;

ii) РНК-направляемого ДНК-связывающего агента; и

iii) гидовой РНК (гРНК), содержащей последовательность, нацеленную на

безопасный приемный локус в клетке или популяции клеток,

с обеспечением, таким образом, экспрессии фактора IX в клетке или популяции клеток.

64. Способ по п. 62 или п. 63, отличающийся тем, что введение осуществляют *in vitro*.

65. Способ по п. 62 или п. 63, отличающийся тем, что введение осуществляют *in vivo*.

66. Способ по любому одному из пп. 62-65, отличающийся тем, что гРНК содержит по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33, или последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33.

67. Композиция для применения для экспрессии фактора IX в клетке, отличающаяся тем, что композиция содержит

i) конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность, кодирующую белок фактора IX;

ii) РНК-направляемый ДНК-связывающий агент; и

iii) гидовую РНК (гРНК), содержащую направляющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33, или последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33.

68. Способ или композиция по любому одному из пп. 40-67, отличающиеся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

69. Способ или композиция по любому одному из пп. 40-68, отличающиеся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas-нуклеазу.

70. Способ или композиция по п. 69, отличающиеся тем, что Cas-нуклеаза представляет собой нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas-нуклеазу.

71. Способ или композиция по любому одному из пп. 40-69, отличающиеся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой мРНК, которая кодирует Cas-нуклеазу.

72. Способ или композиция по п. 71, отличающиеся тем, что мРНК представляет собой модифицированную мРНК.

73. Способ или композиция по любому одному из пп. 69-72, отличающиеся тем, что Cas-нуклеаза представляет собой Cas-нуклеазу класса 2.

74. Способ или композиция по любому одному из пп. 69-73, отличающиеся тем, что Cas-нуклеаза представляет собой Cas9.

75. Способ или композиция по любому одному из пп. 69-74, отличающиеся тем, что Cas-нуклеаза выбрана из группы, состоящей из нуклеазы *S. pyogenes*, нуклеазы *S. aureus*, нуклеазы *C. jejuni*, нуклеазы *S. thermophilus*, нуклеазы *N. meningitidis* и их

вариантов.

76. Способ или композиция по п. 75, отличающиеся тем, что Cas-нуклеаза представляет собой Cas9-нуклеазу *S. pyogenes* или ее вариант.

77. Способ или композиция по любому одному из пп. 69-76, отличающиеся тем, что Cas-нуклеаза обладает сайт-специфической ДНК-связывающей активностью.

78. Способ или композиция по любому одному из пп. 69-77, отличающиеся тем, что Cas-нуклеаза представляет собой никазу.

79. Способ или композиция по любому одному из пп. 69-77, отличающиеся тем, что Cas-нуклеаза представляет собой кливазу.

80. Способ по любому одному из пп. 69-77, отличающийся тем, что Cas-нуклеаза не обладает активностью никазы или кливазы.

81. Композиция для применения при экспрессии фактора IX в клетке или популяции клеток, отличающаяся тем, что композиция содержит двунаправленную конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность, кодирующую белок фактора IX.

82. Клетка-хозяин, полученная способом или с применением композиции по любому предшествующему пункту.

83. Клетка-хозяин по п. 82, отличающаяся тем, что клетка-хозяин представляет собой клетку печени.

84. Клетка-хозяин по п. 82 или п. 83, отличающаяся тем, что клетка-хозяин относится к типу неделящихся клеток.

85. Клетка-хозяин по любому одному из пп. 82-84, отличающаяся тем, что клетка-хозяин экспрессирует полипептид фактора IX, кодируемый двунаправленной конструкцией.

86. Клетка-хозяин по любому одному из пп. 82-85, отличающаяся тем, что клетка-хозяин представляет собой гепатоцит.

87. Способ, композиция или клетка-хозяин по любому предшествующему пункту, отличающиеся тем, что гРНК содержит SEQ ID NO: 401.

88. Способ лечения дефицита фактора IX, включающий введение индивиду с дефицитом фактора IX

i) двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую белок фактора IX;

ii) РНК-направляемого ДНК-связывающего агента или последовательности, кодирующей РНК-направляемый ДНК-связывающий агент; и

iii) гидовой РНК (гРНК), содержащей последовательность, нацеленную на безопасный приемный локус,

с обеспечением, таким образом, экспрессии белка фактора IX у индивида.

89. Способ по п. 88, дополнительно включающий экспрессию терапевтически эффективного количества белка фактора IX.

90. Способ по п. 88 или п. 89, дополнительно включающий достижение

терапевтически эффективного уровня коагуляционной активности циркулирующего фактора IX у индивида.

91. Способ по любому одному из пп. 88-90, отличающийся тем, что индивид представляет собой человека.

92. Способ по любому одному из пп. 88-91, дополнительно включающий достижение активности циркулирующего FIX или уровней белка FIX, составляющих по меньшей мере около 1% от нормы, например по меньшей мере около 5% от нормы.

93. Способ по любому одному из пп. 88-92, отличающийся тем, что активность циркулирующего FIX или уровни белка FIX составляют менее чем около 150% от нормы.

94. Способ по любому одному из пп. 88-93, дополнительно включающий достижение активности циркулирующего FIX или уровней белка FIX, составляющих по меньшей мере от около 1% до около 150% от нормы.

95. Способ по любому одному из пп. 88-94, дополнительно включающий достижение повышения активности FIX по сравнению с исходной активностью FIX у индивида на по меньшей мере около 1% от нормальной активности FIX.

96. Способ по любому одному из пп. 88-95, дополнительно включающий достижение повышения активности FIX по сравнению с исходной активностью FIX у индивида на по меньшей мере около 50% от нормальной активности FIX.

97. Способ по любому одному из пп. 88-96, дополнительно включающий достижение у индивида устойчивого и продолжительного эффекта, например, эффекта, длящегося по меньшей мере 1 месяц, 2 месяца, 6 месяцев, 1 год или 2 года.

98. Способ по любому одному из пп. 88-97, отличающийся тем, что уровни циркулирующего альбумина у индивида являются нормальными по меньшей мере через 1 месяц, 2 месяца, 6 месяцев или 1 год после введения двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты.

99. Способ по любому одному из пп. 88-99, отличающийся тем, что уровни циркулирующего альбумина у индивида сохраняются через 4 недели после введения двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты.

100. Способ по любому одному из пп. 88-99, отличающийся тем, что уровни циркулирующего альбумина у индивида временно падают, а потом возвращаются к норме.

101. Способ по любому одному из пп. 88-100, отличающийся тем, что гидовая РНК содержит по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33.

102. Способ по любому одному из пп. 88-101, отличающийся тем, что гидовая РНК содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33.

103. Способ по любому одному из пп. 88-102, отличающийся тем, что гидовая РНК содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33.

104. Способ, композиция или клетка-хозяин по любому предшествующему пункту,

отличающиеся тем, что гидовая РНК содержит SEQ ID NO: 401 или 402.

105. Способ, композиция или клетка-хозяин по любому предшествующему пункту, отличающиеся тем, что фактор IX представляет собой фактор IX человека.

106. Способ, композиция или клетка-хозяин по любому предшествующему пункту, отличающиеся тем, что фактор IX представляет собой рекомбинантный фактор IX человека.

107. Способ, композиция или клетка-хозяин по любому предшествующему пункту, отличающиеся тем, что фактор IX представляет собой гиперфункциональный вариант фактора IX.

108. Способ, композиция или клетка-хозяин по любому предшествующему пункту, отличающиеся тем, что фактор IX представляет собой вариант фактора IX человека, содержащий замену R338.

109. Применение композиции или конструкции по любому предшествующему пункту для лечения дефицита фактора IX у индивида.

110. Применение композиции или конструкции по любому предшествующему пункту для лечения гемофилии В у индивида.

111. Способ и композиция по любому одному из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что гидовая РНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 2.

112. Способ и композиция по любому одному из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что гидовая РНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 3.

113. Способ и композиция по любому одному из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что гидовая РНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 4.

114. Способ и композиция по любому одному из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что гидовая РНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 5.

115. Способ и композиция по любому одному из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что гидовая РНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 6.

116. Способ и композиция по любому одному из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что гидовая РНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 7.

117. Способ и композиция по любому одному из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что гидовая РНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 8.

118. Способ и композиция по любому одному из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что гидовая РНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 9.

отличающиеся тем, что гидовая РНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 23.

133. Способ и композиция по любому одному из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что гидовая РНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 24.

134. Способ и композиция по любому одному из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что гидовая РНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 25.

135. Способ и композиция по любому одному из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что гидовая РНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 26.

136. Способ и композиция по любому одному из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что гидовая РНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 27.

137. Способ и композиция по любому одному из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что гидовая РНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 28.

138. Способ и композиция по любому одному из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что гидовая РНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 29.

139. Способ и композиция по любому одному из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что гидовая РНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 30.

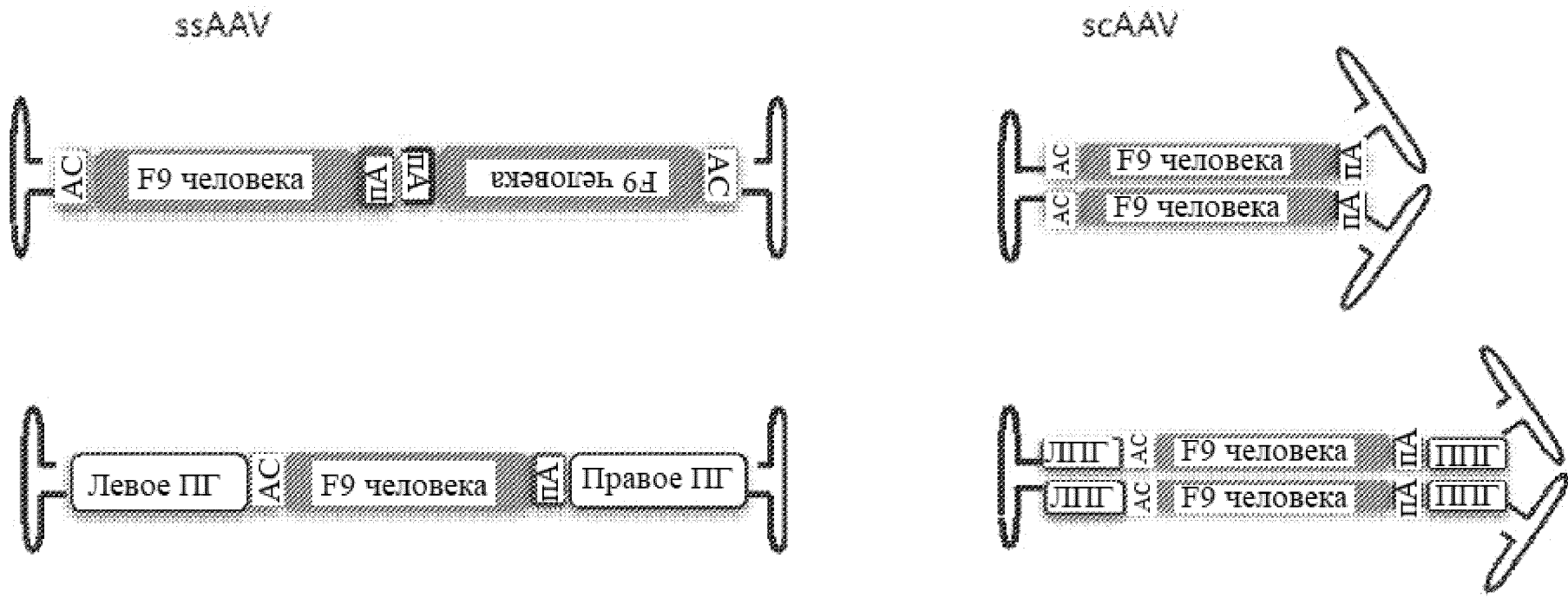
140. Способ и композиция по любому одному из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что гидовая РНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 31.

141. Способ и композиция по любому одному из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что гидовая РНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 32.

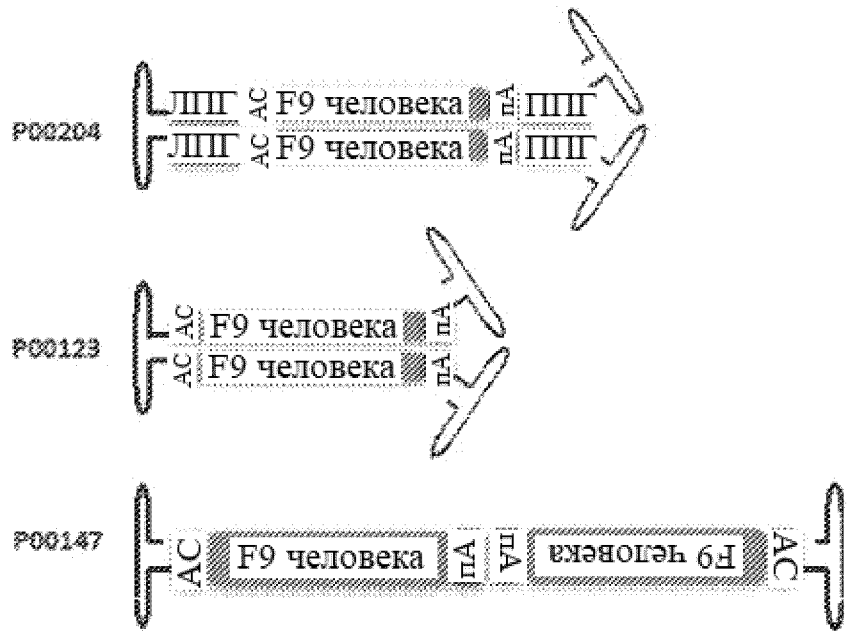
142. Способ и композиция по любому одному из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что гидовая РНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 33.

143. Способ и композиция по любому одному из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что гидовая РНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-5, 10-17, 21-27 и 29-33.

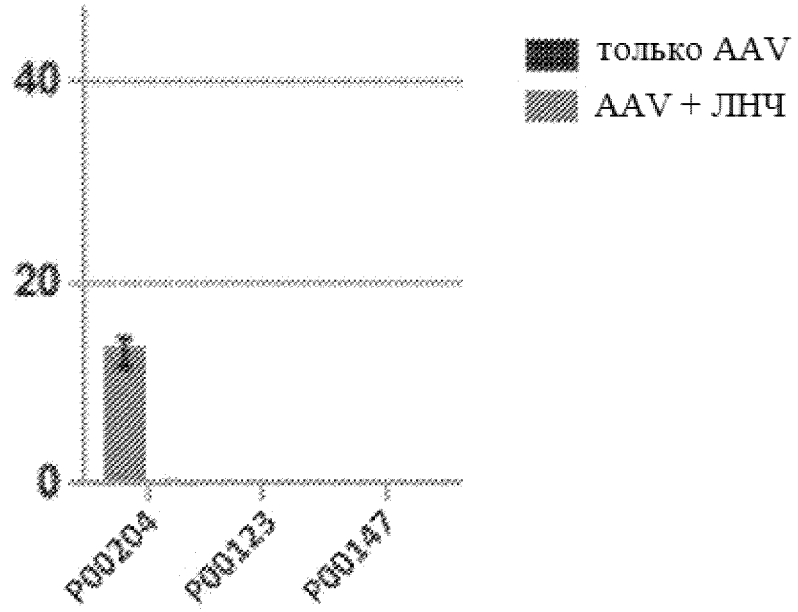
По доверенности



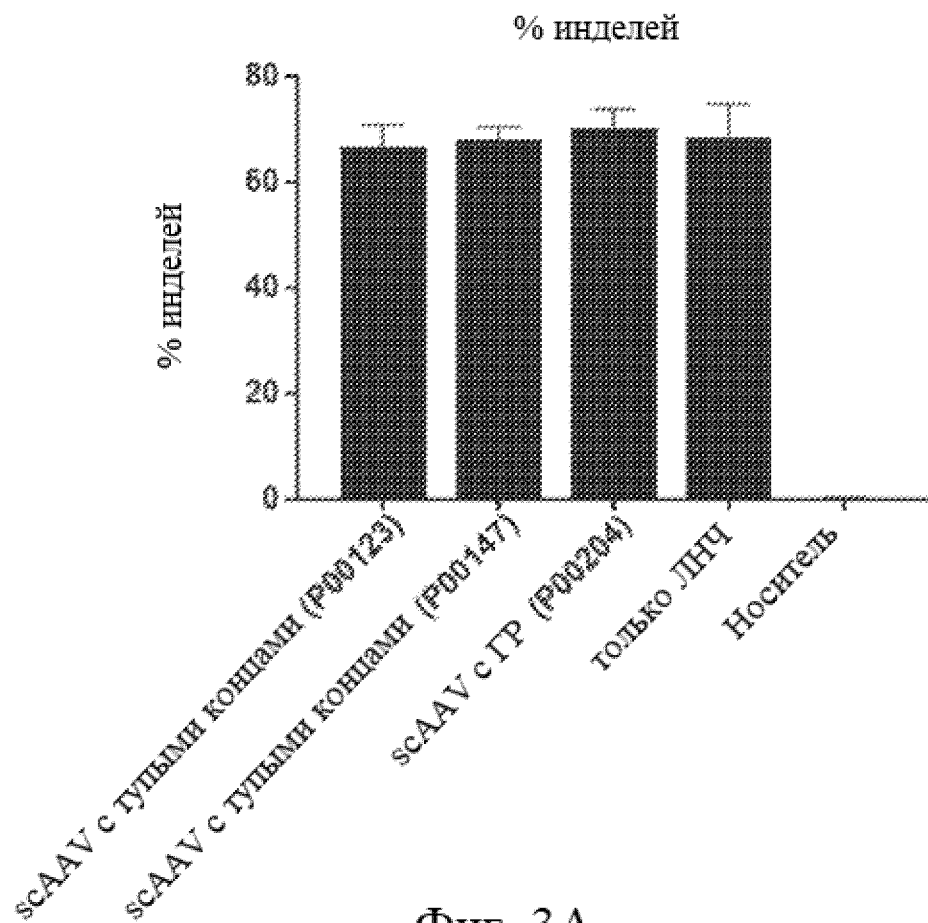
Фиг. 1



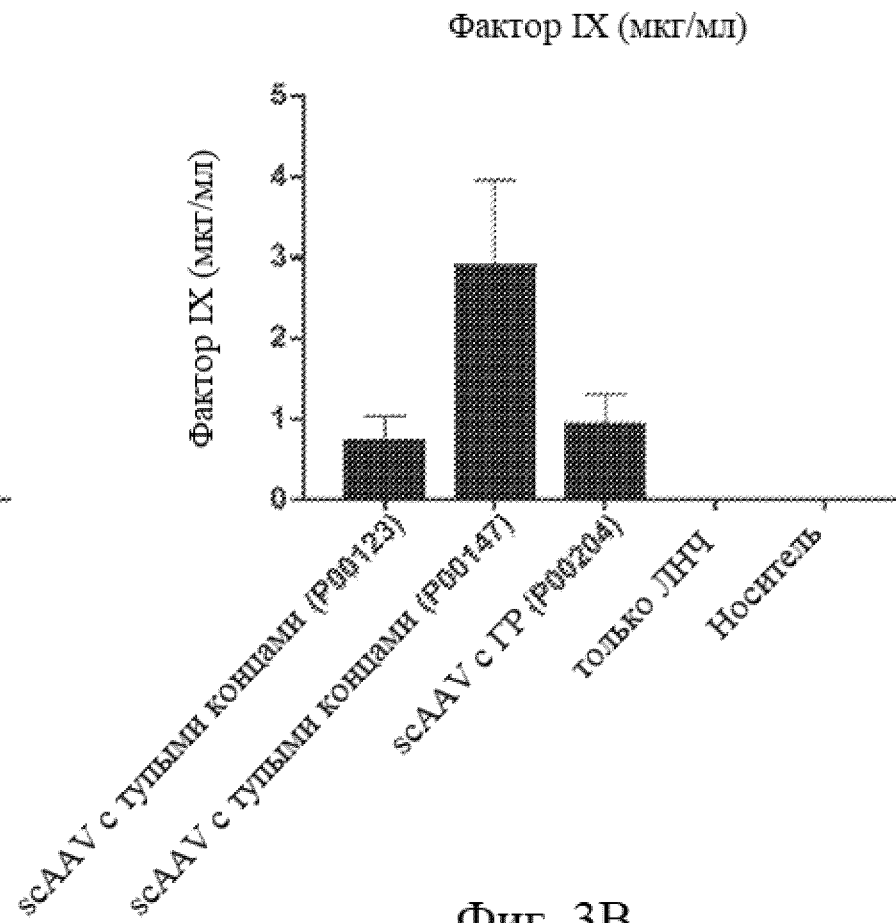
F9 человека (нг/мл)



Фиг. 2

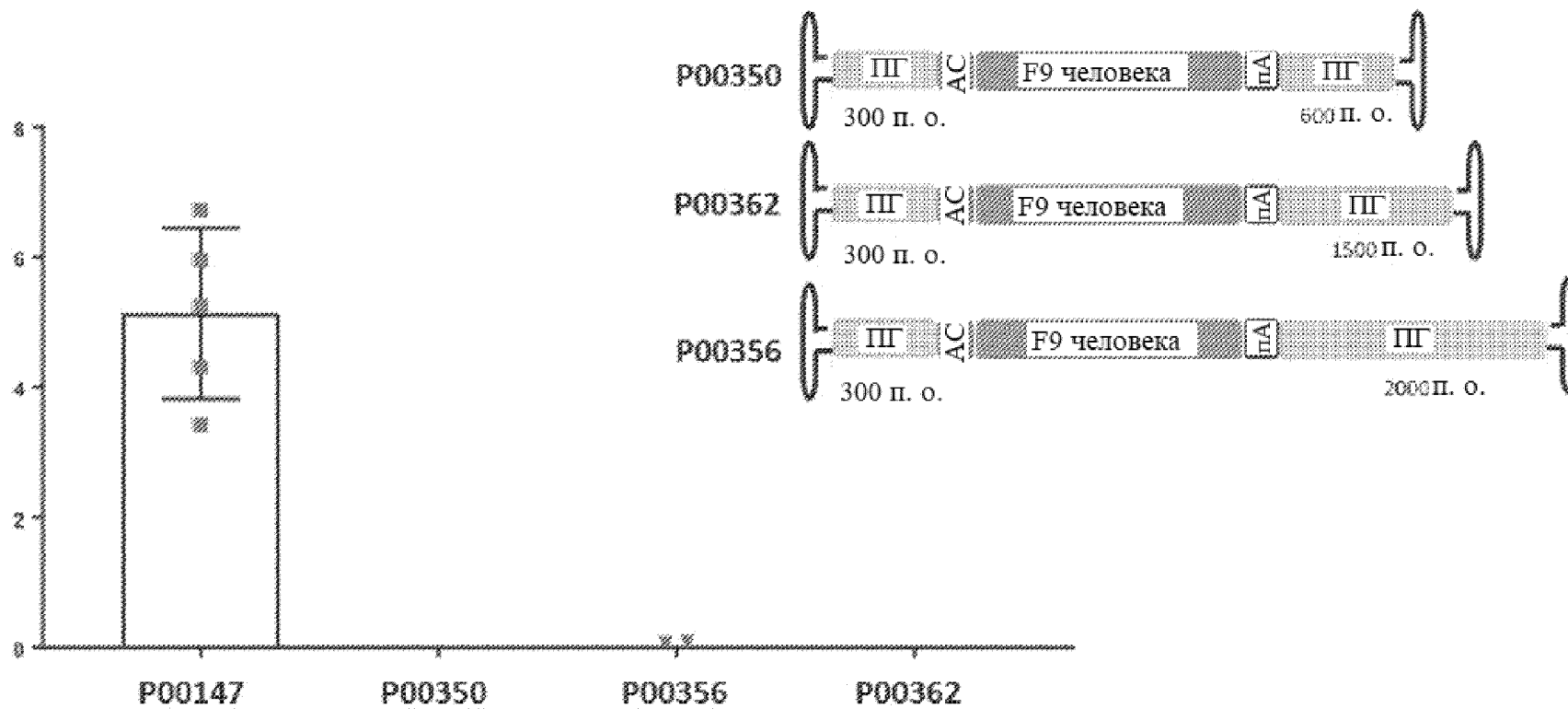


Фиг. 3А

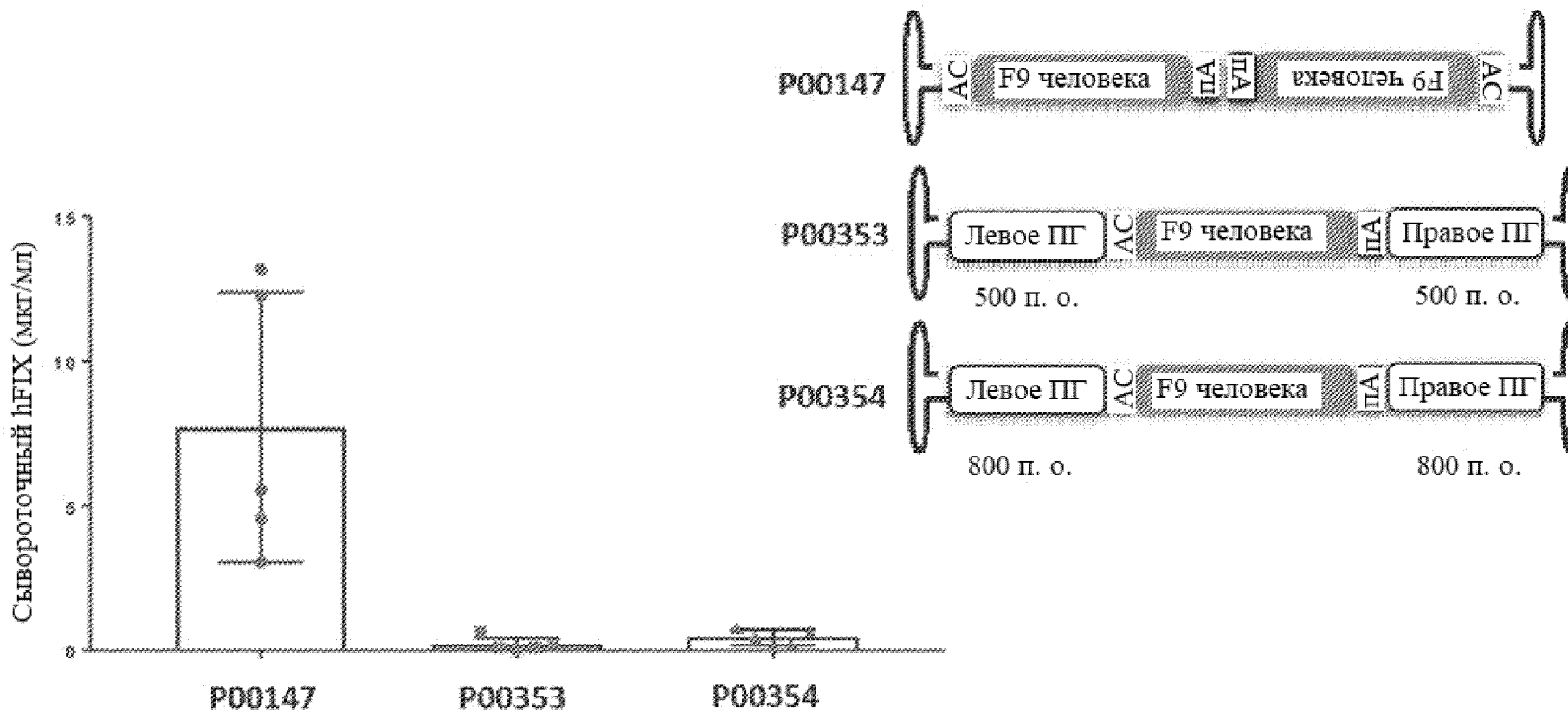


Фиг. 3В

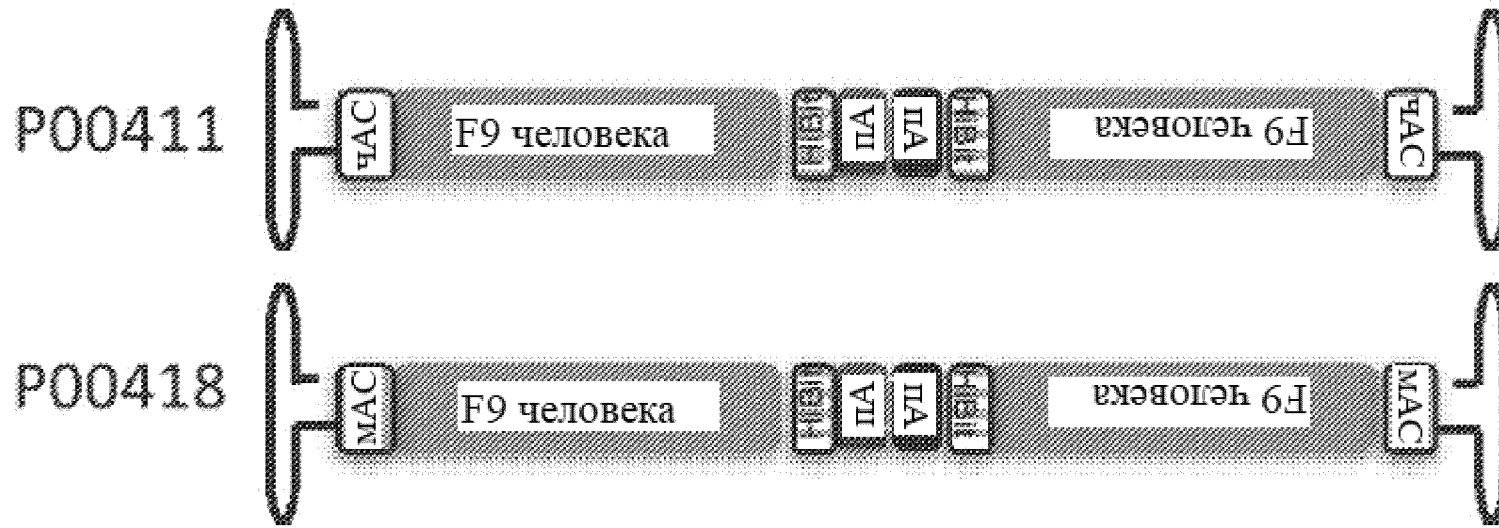
Сывороточный hFIX (мкг/мл)



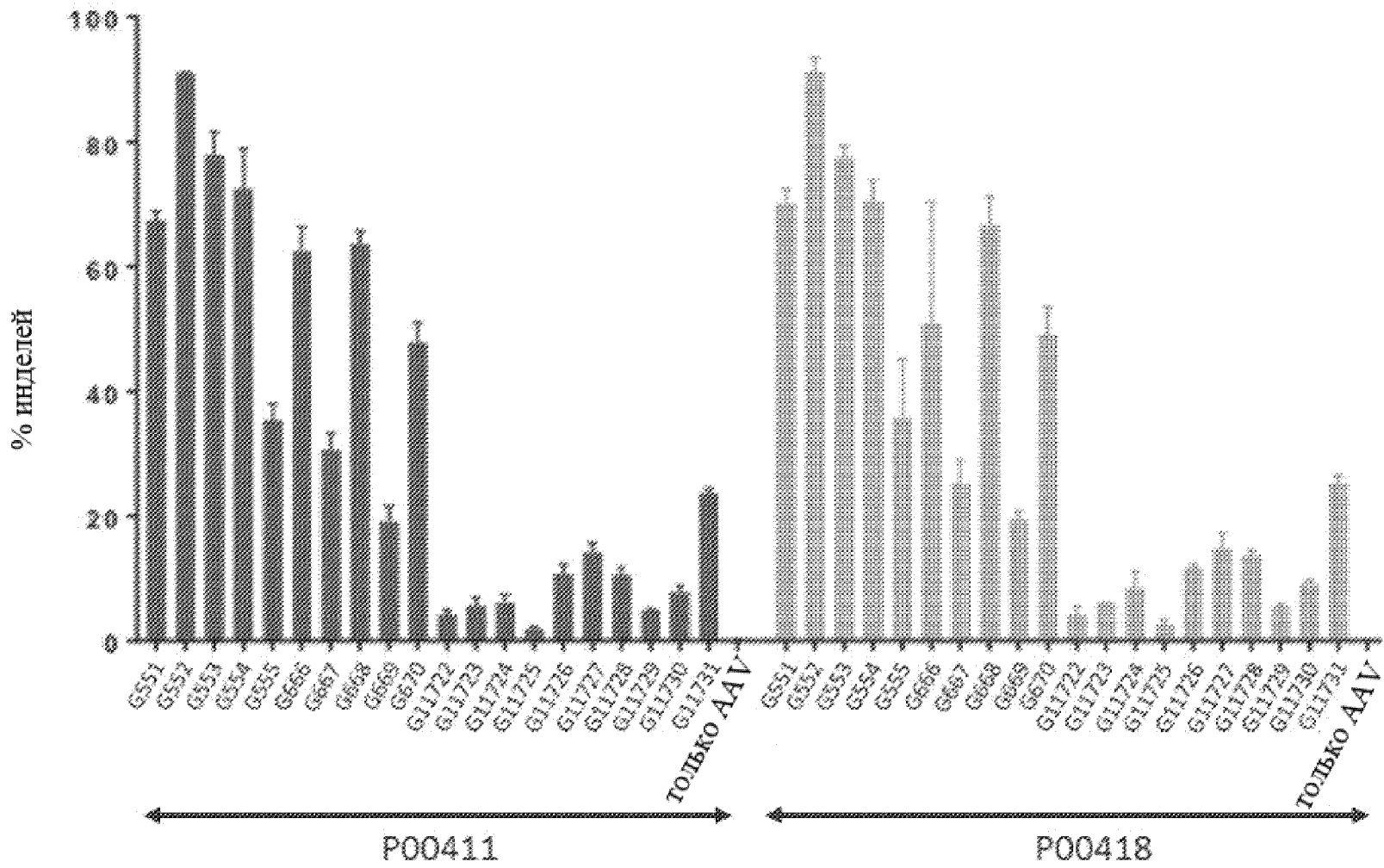
Фиг. 4А



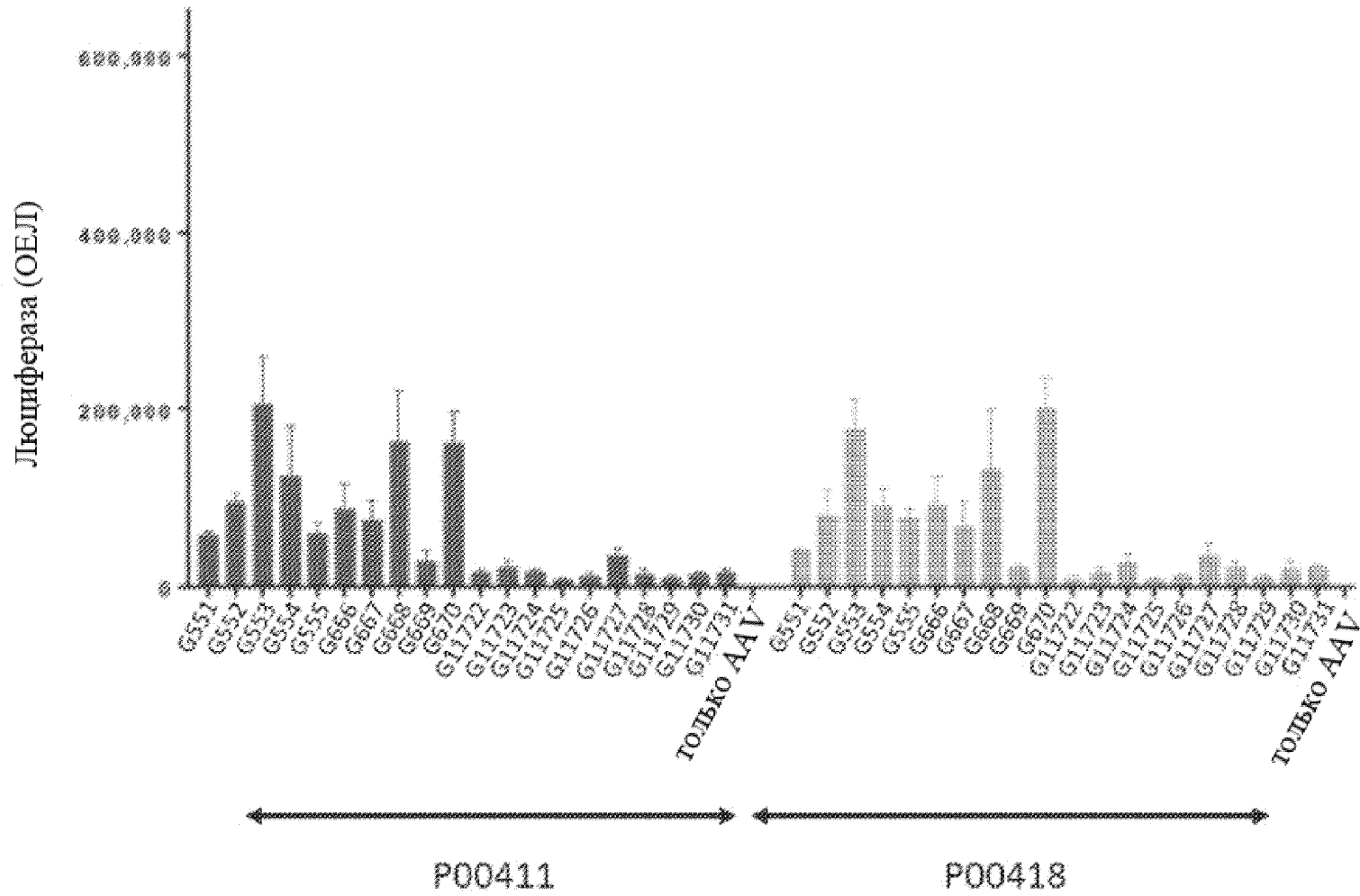
Фиг. 4В



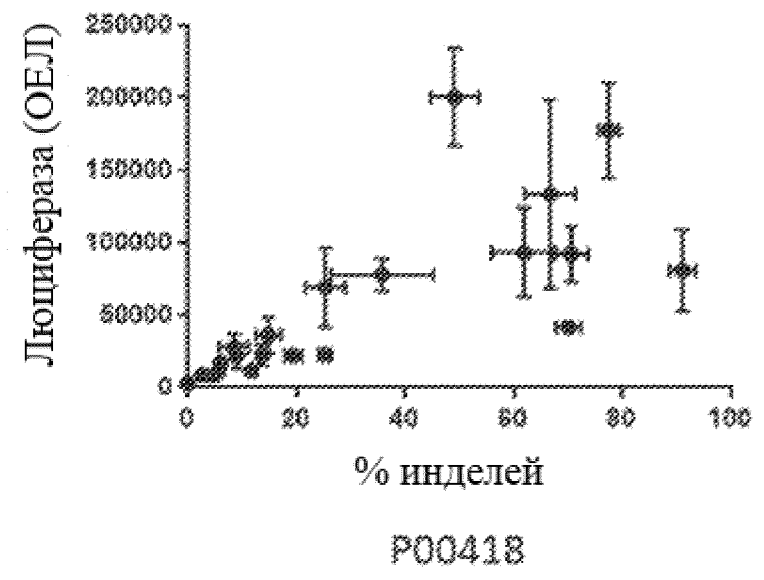
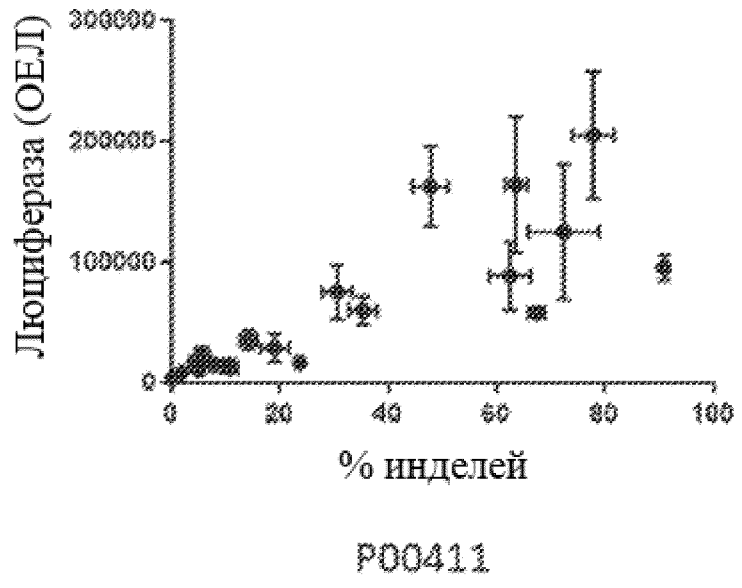
Фиг. 5А



Фиг. 5В

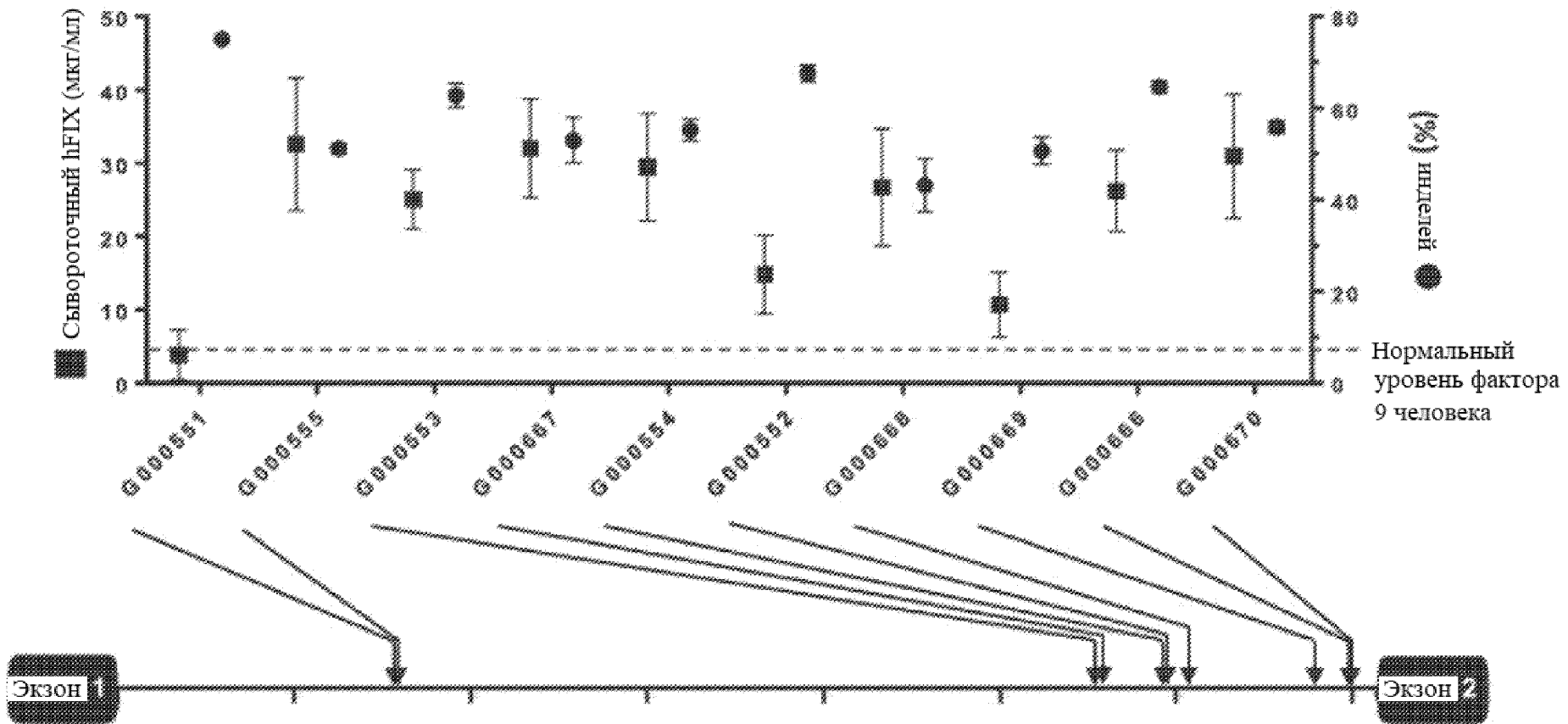


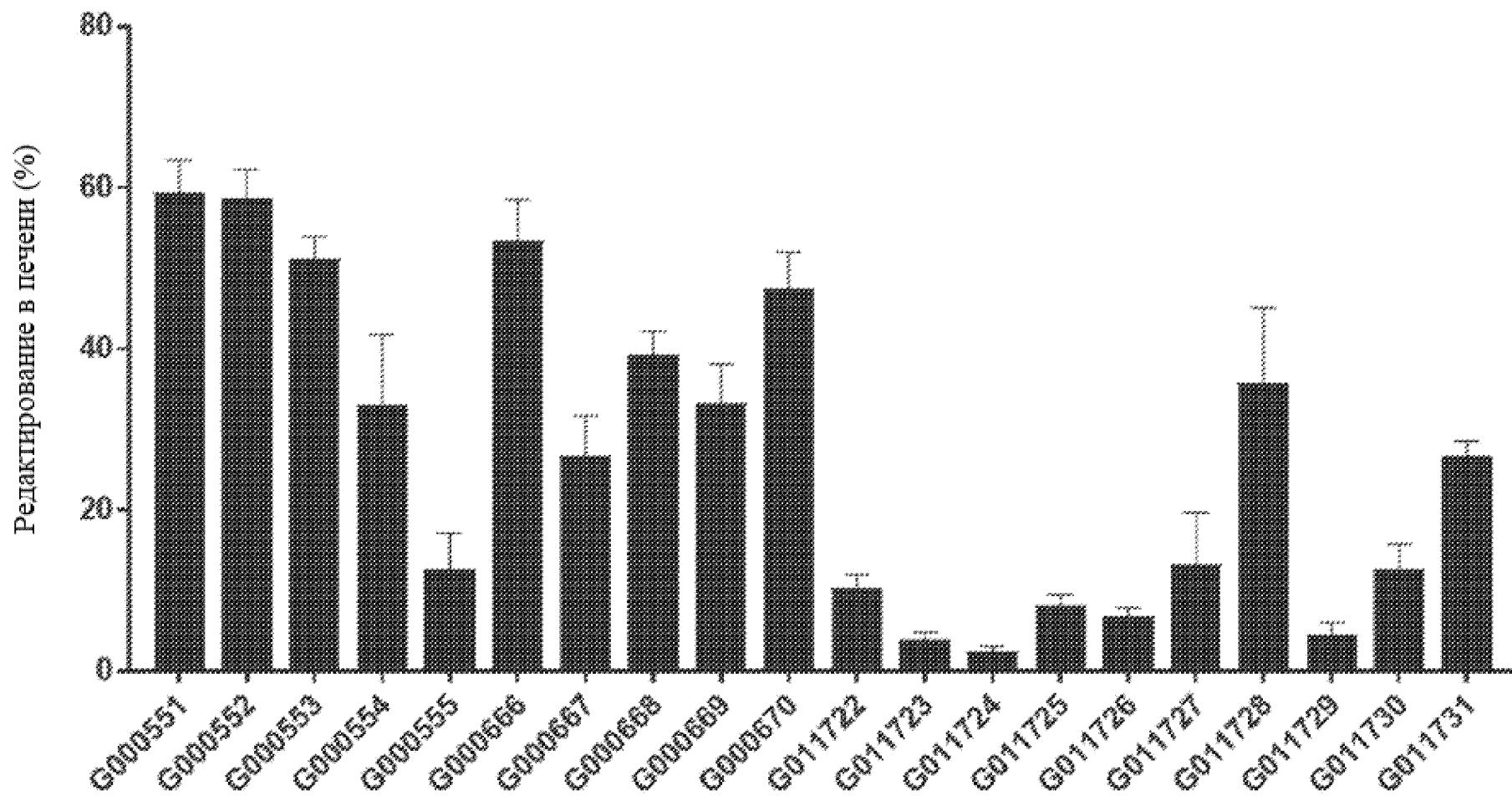
Фиг. 5С



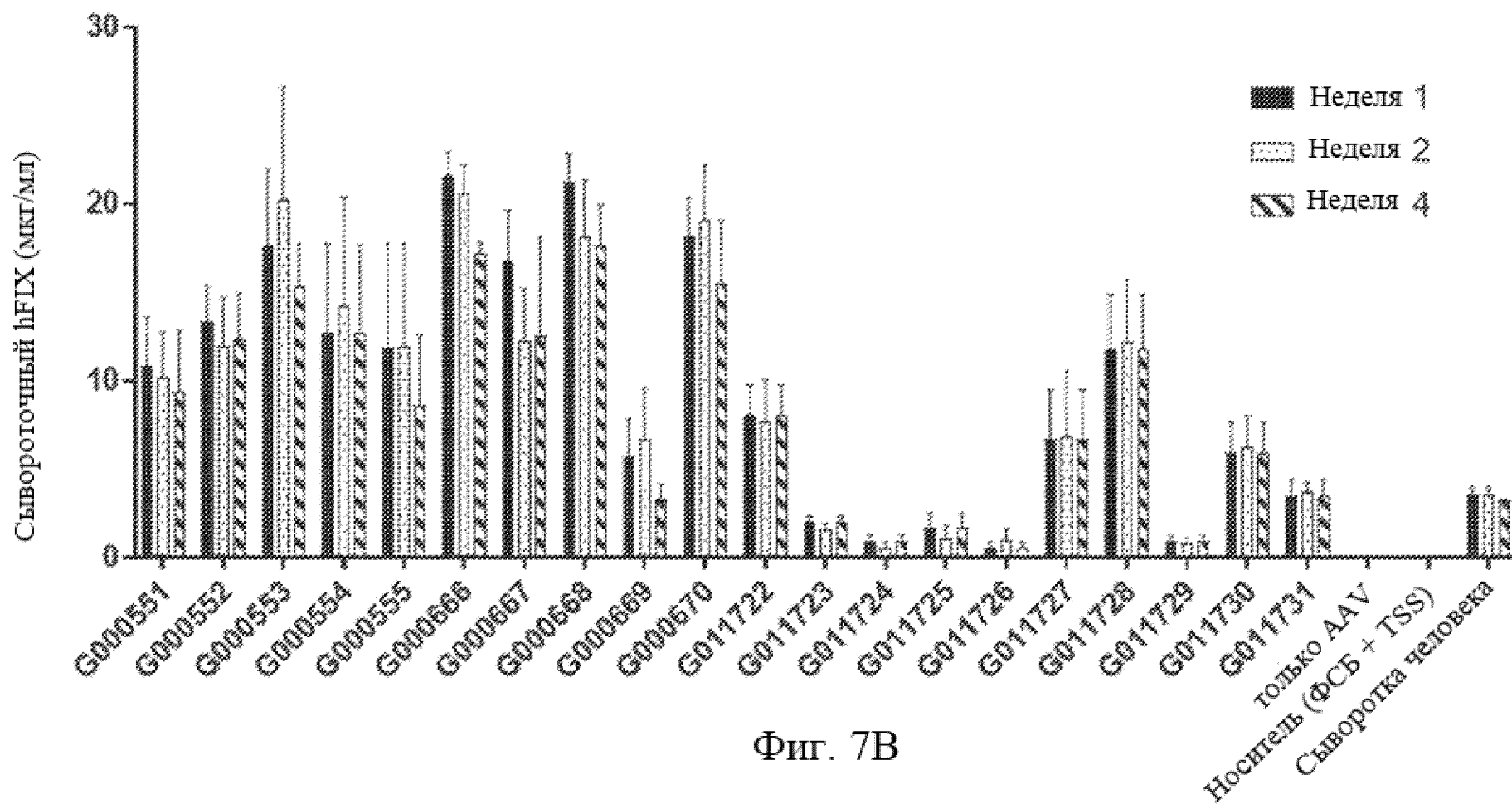
Фиг. 5D

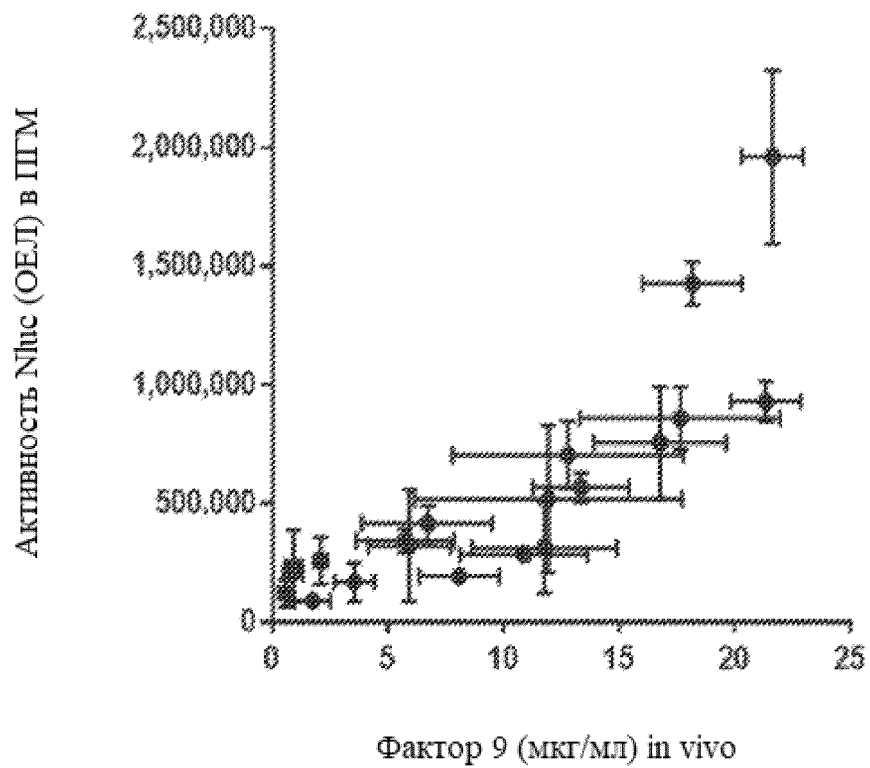
Фиг. 6



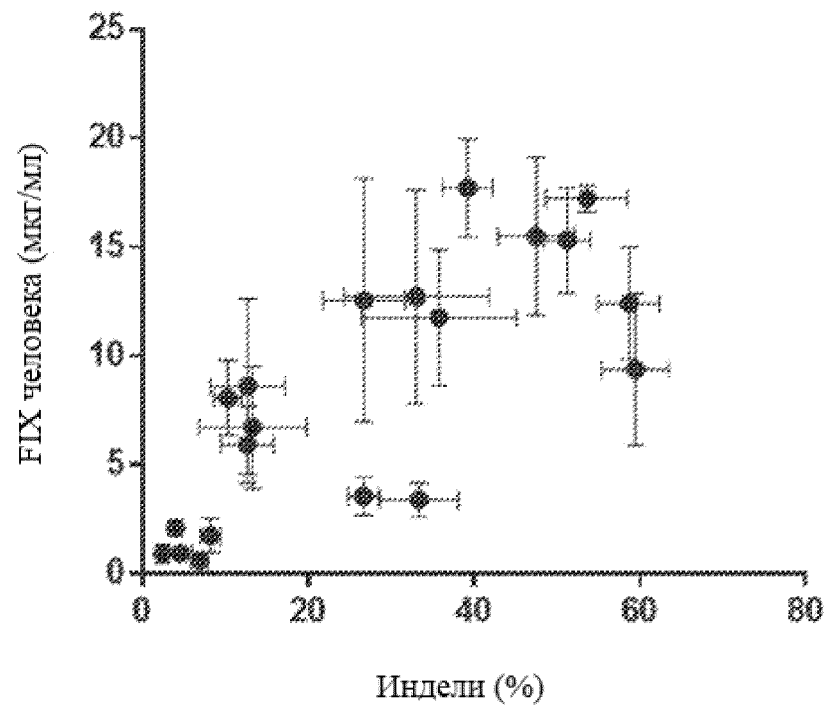


Фиг. 7А



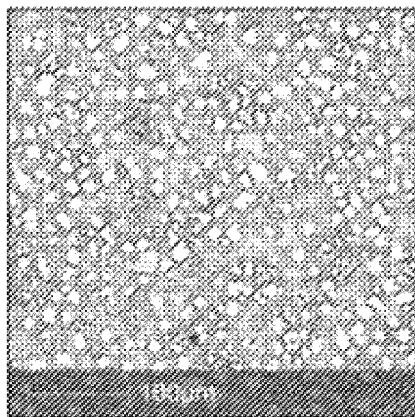


Фиг. 7C



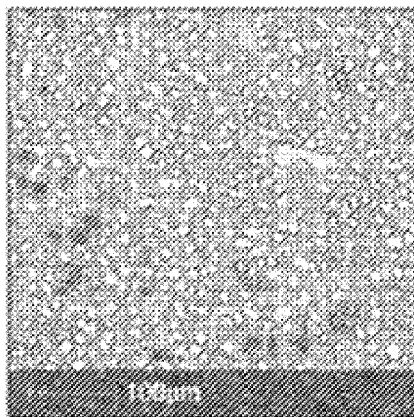
Фиг. 7D

только AAV



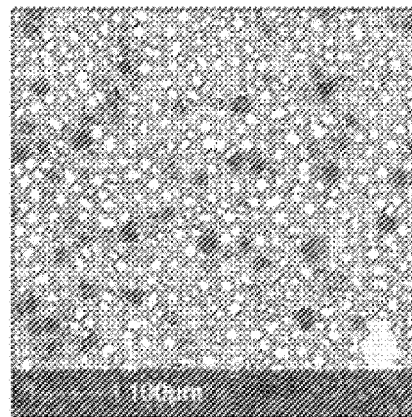
Менее 1,0% клеток, положительных в отношении гибридного транскрипта

G011723



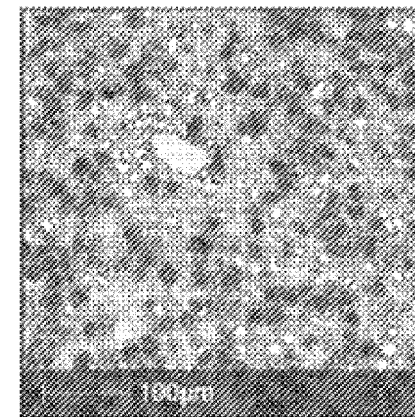
4,9% клеток, положительных в отношении гибридного транскрипта

G000551



19,8% клеток, положительных в отношении гибридного транскрипта

G000666

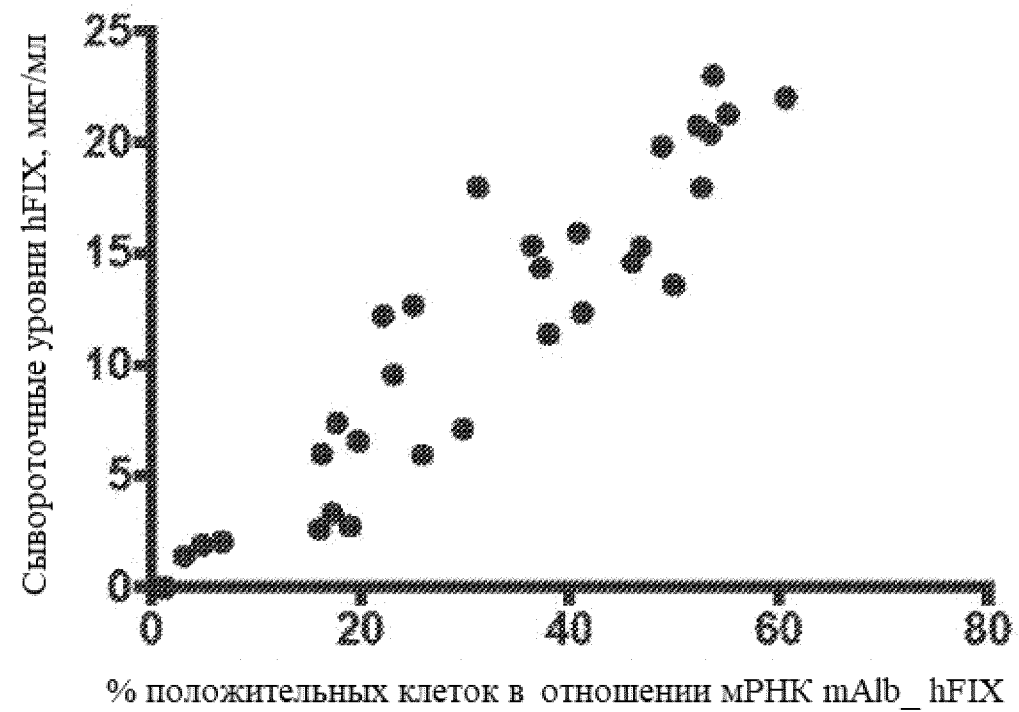


52,3% клеток, положительных в отношении гибридного транскрипта мкм

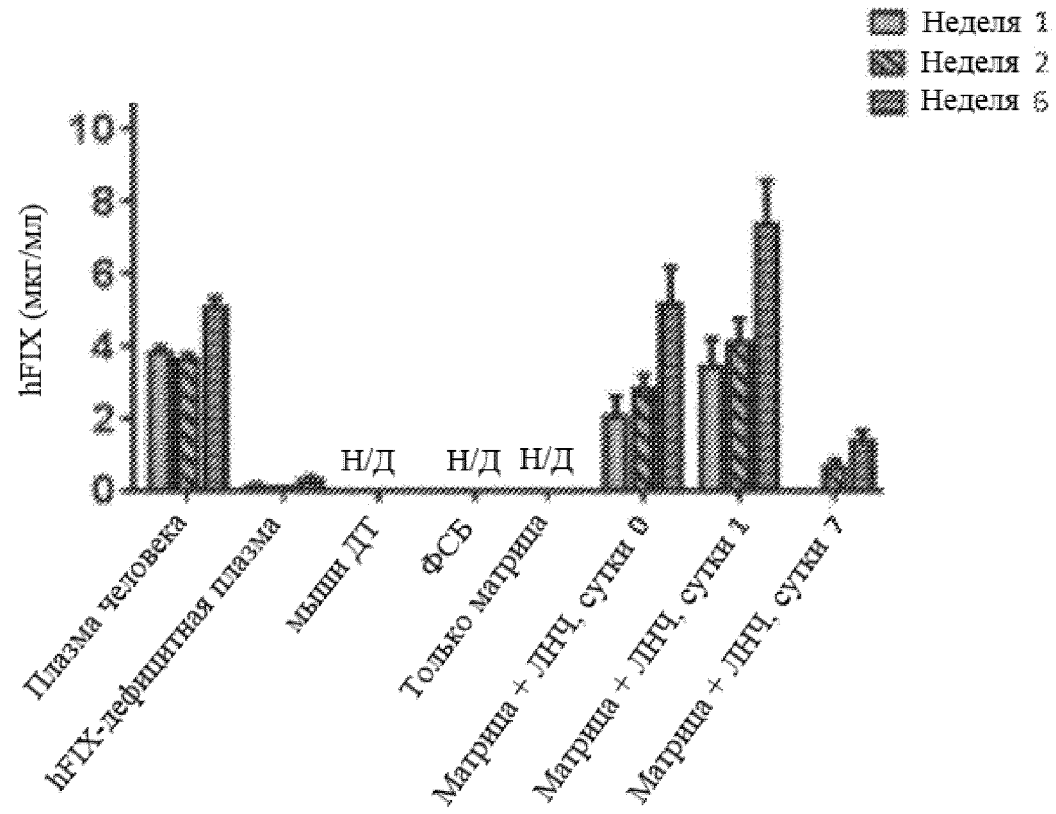
Фиг. 8А

Фиг. 8В

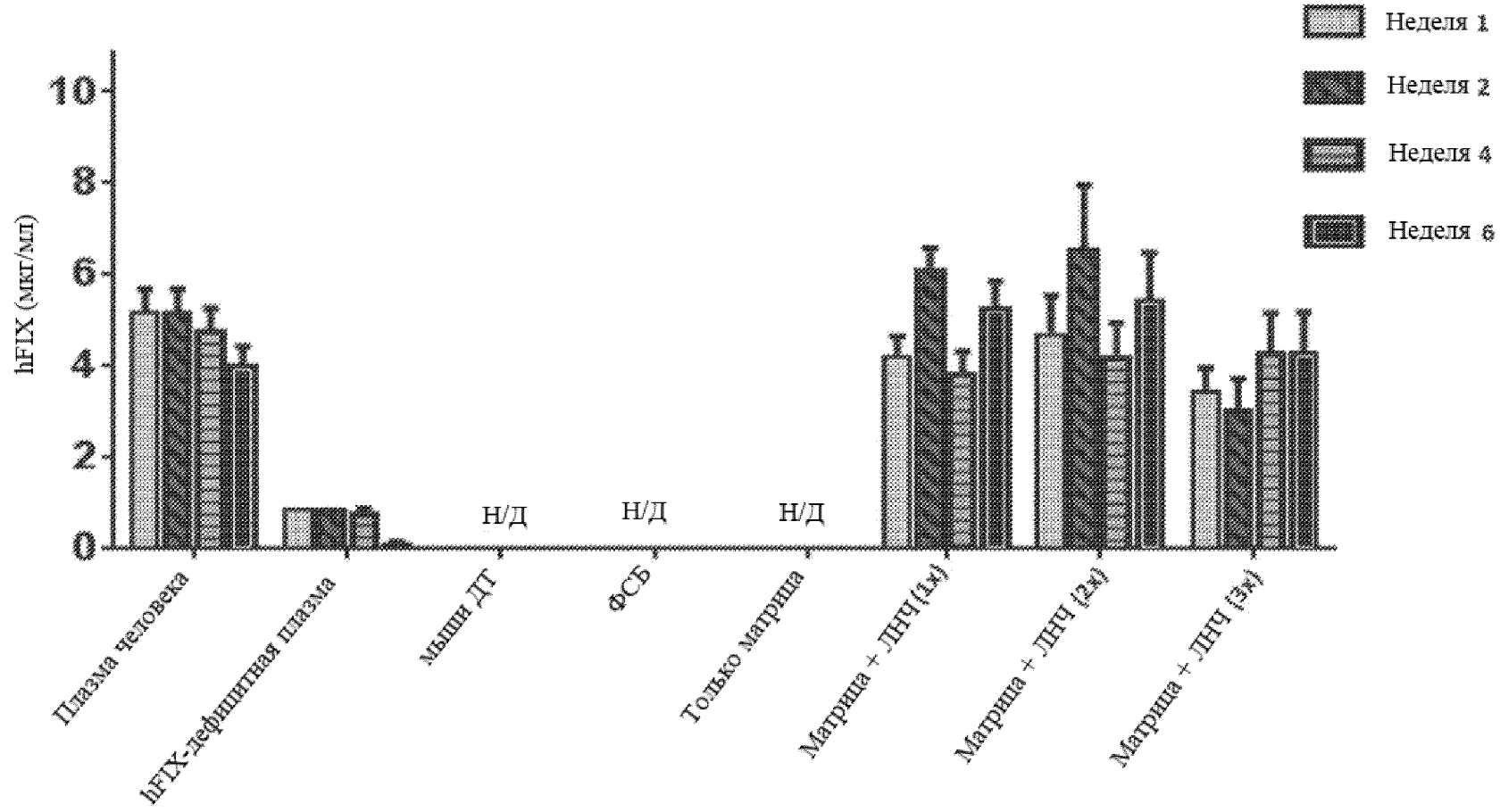
Уровни hFIX, неделя 1 vs. % положительных клеток



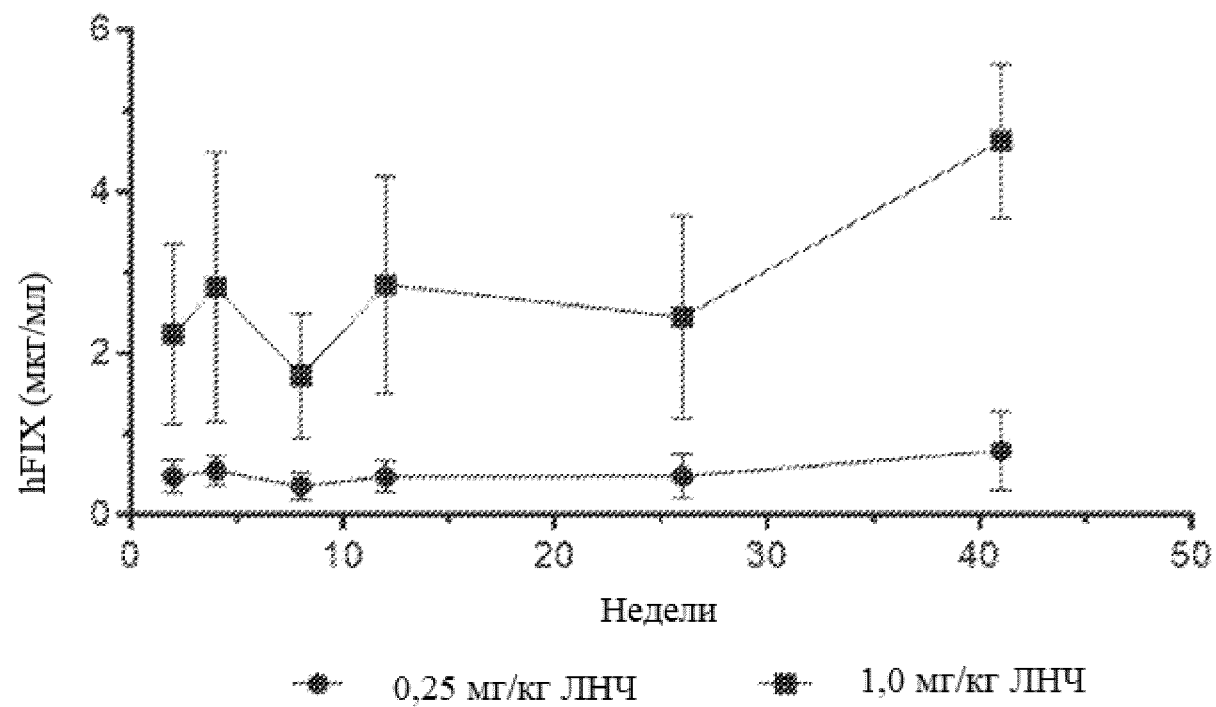
Фиг. 9



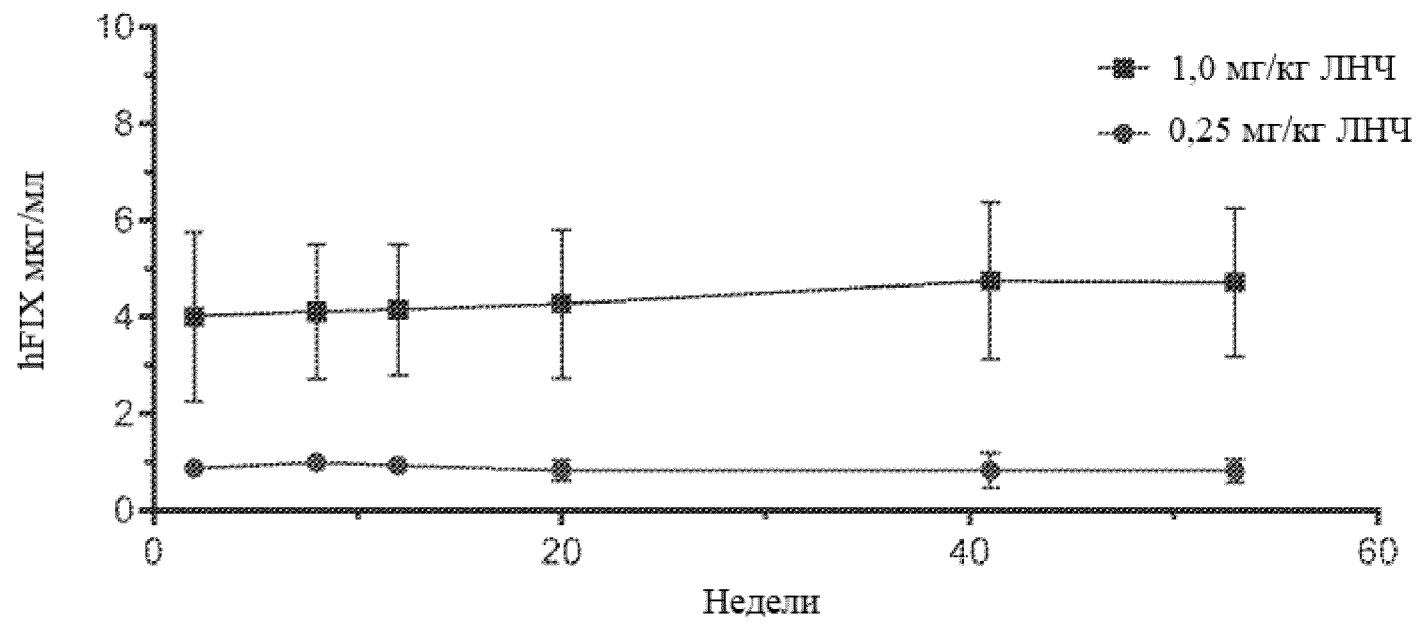
Фиг. 10



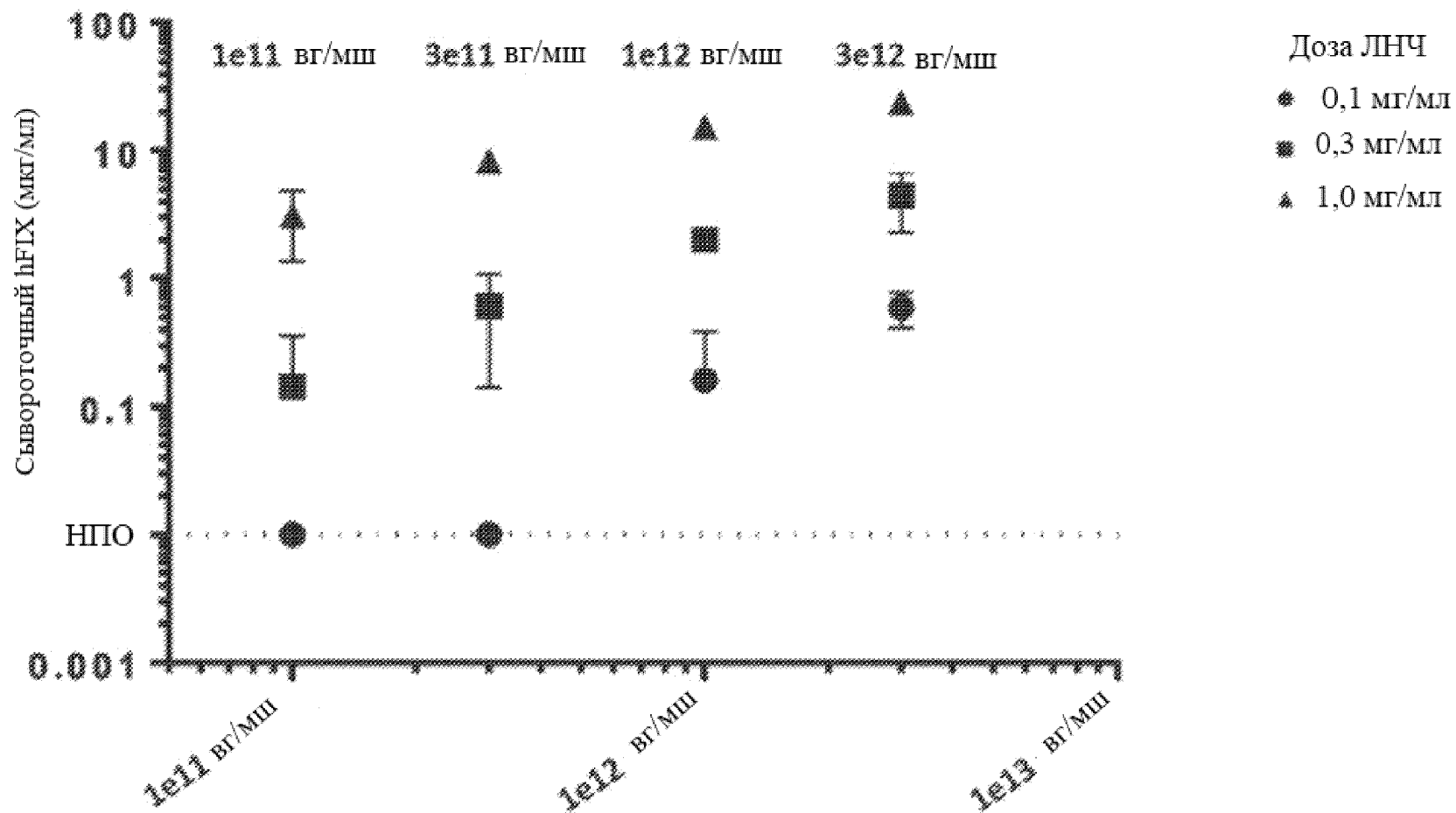
Фиг. 11А



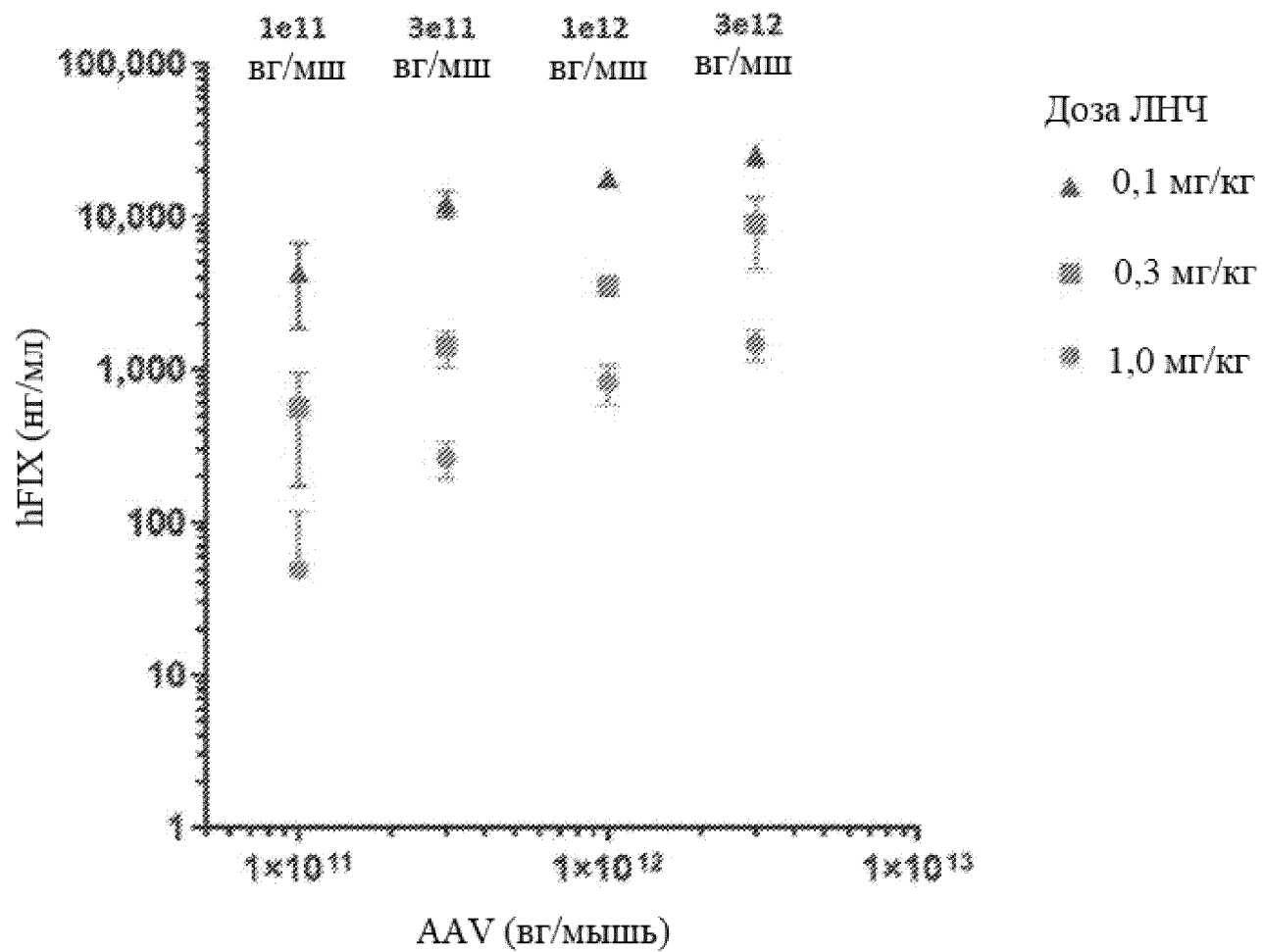
Фиг. 11В



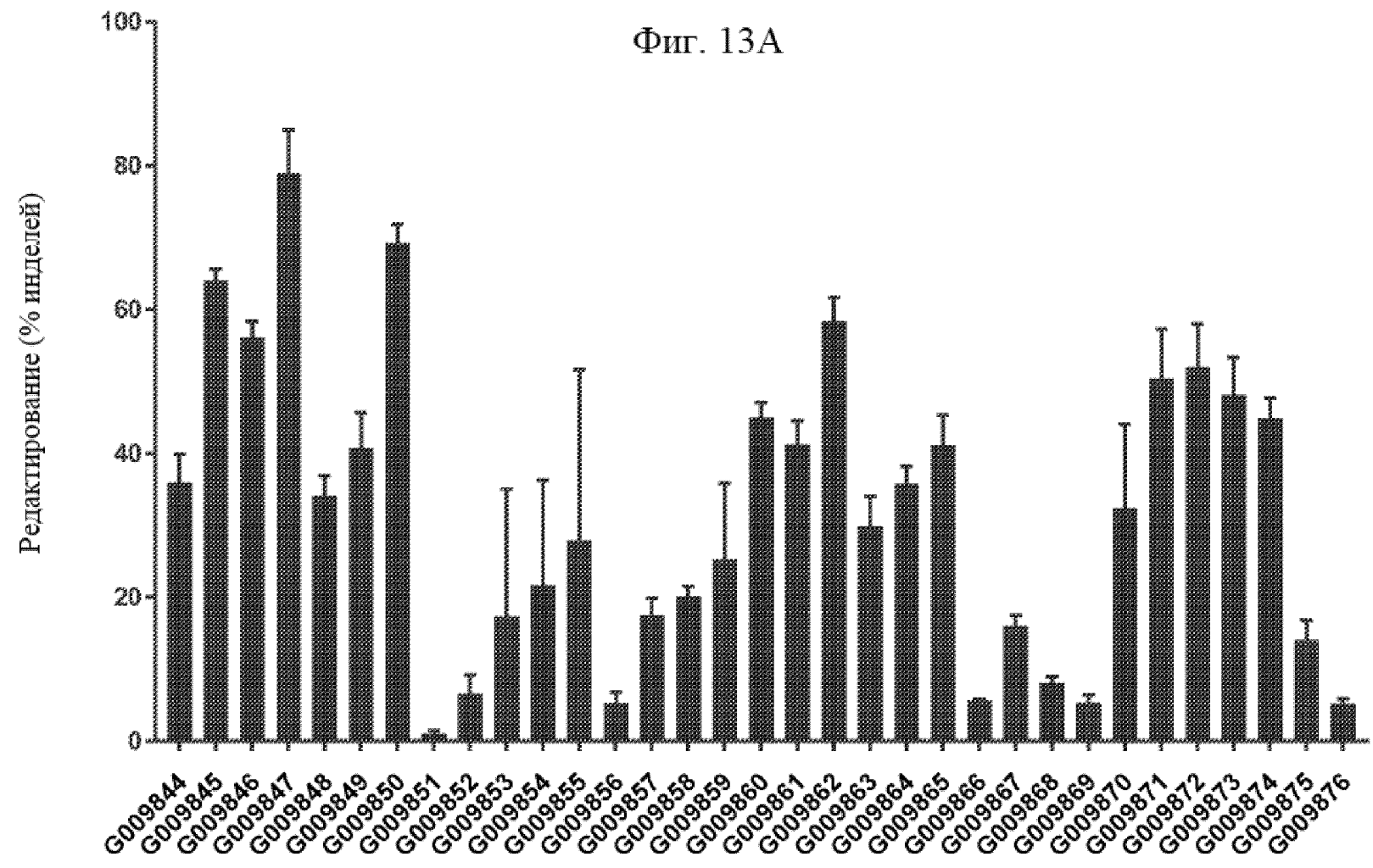
Фиг. 12А

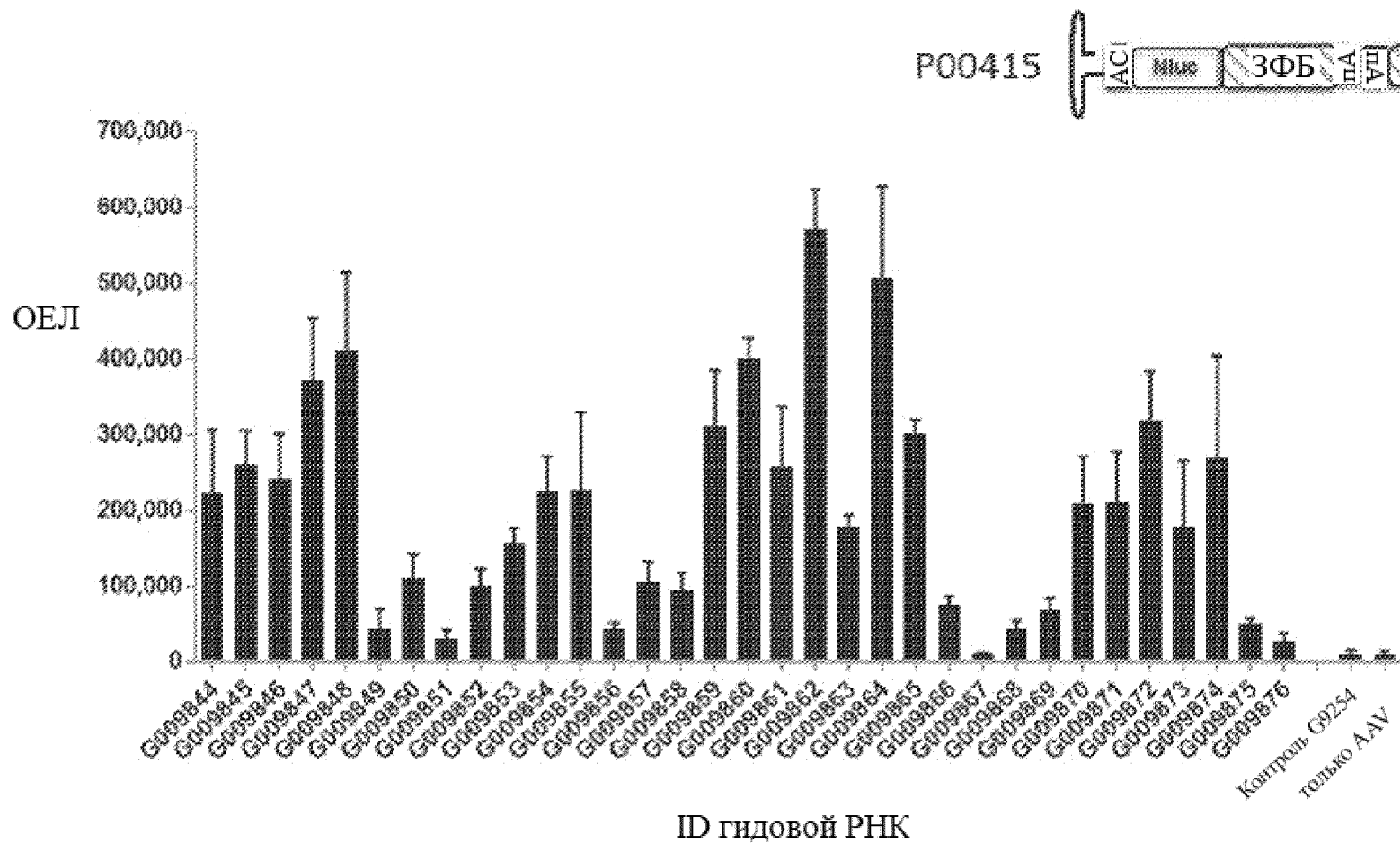


Фиг. 12В



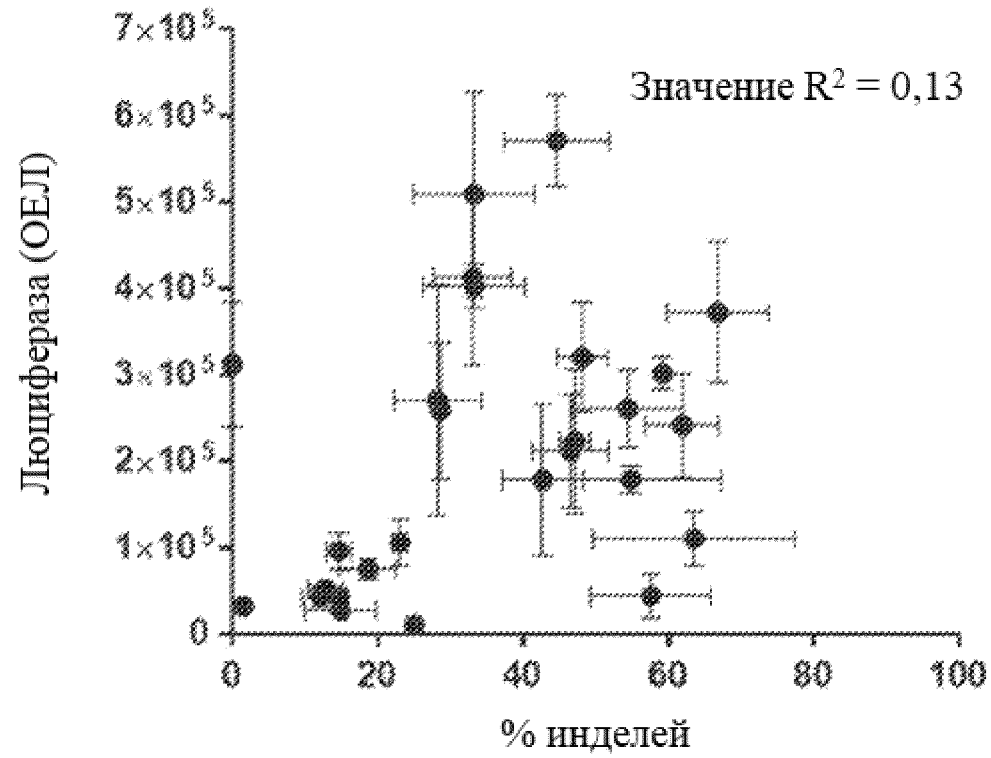
Фиг. 13А



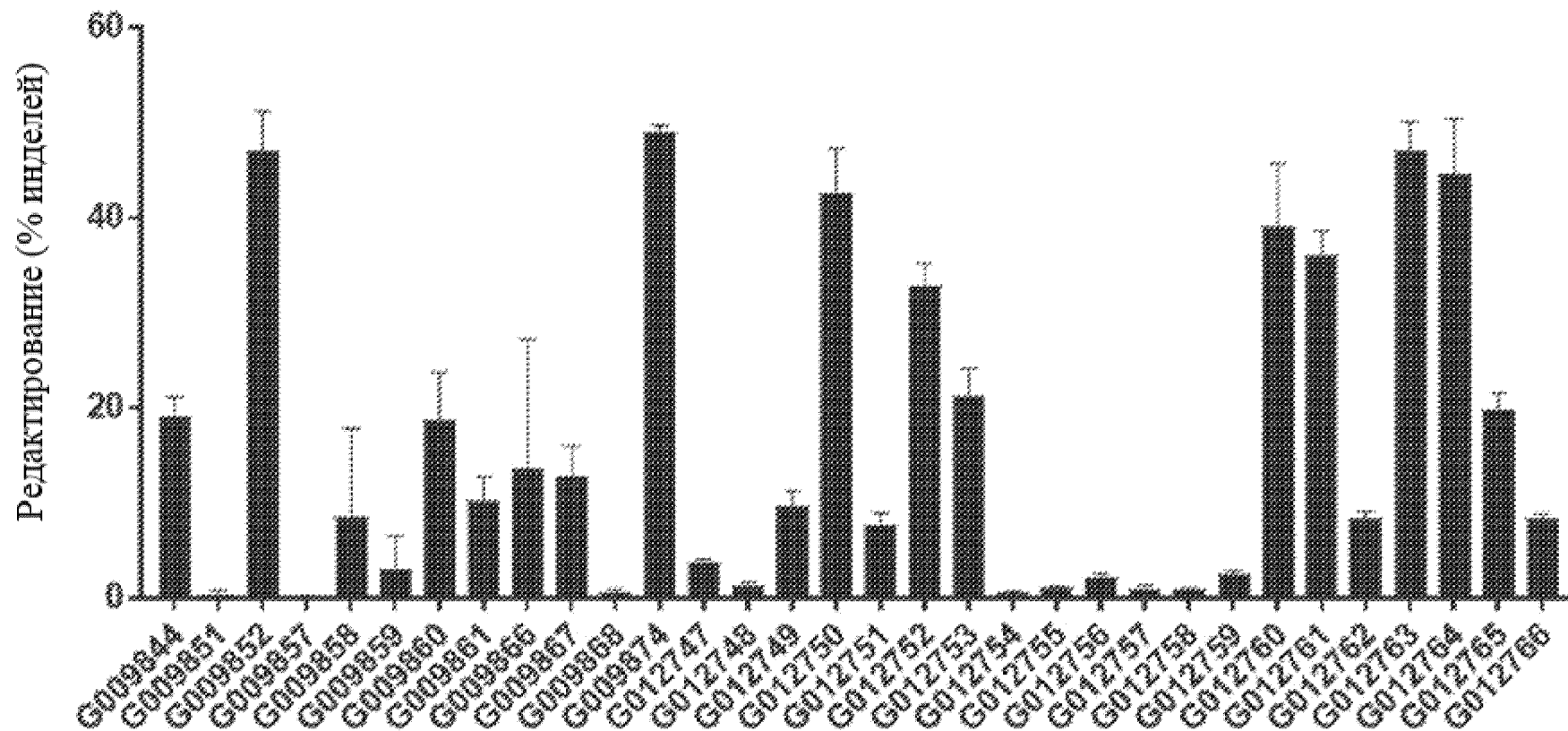


Фиг. 13В

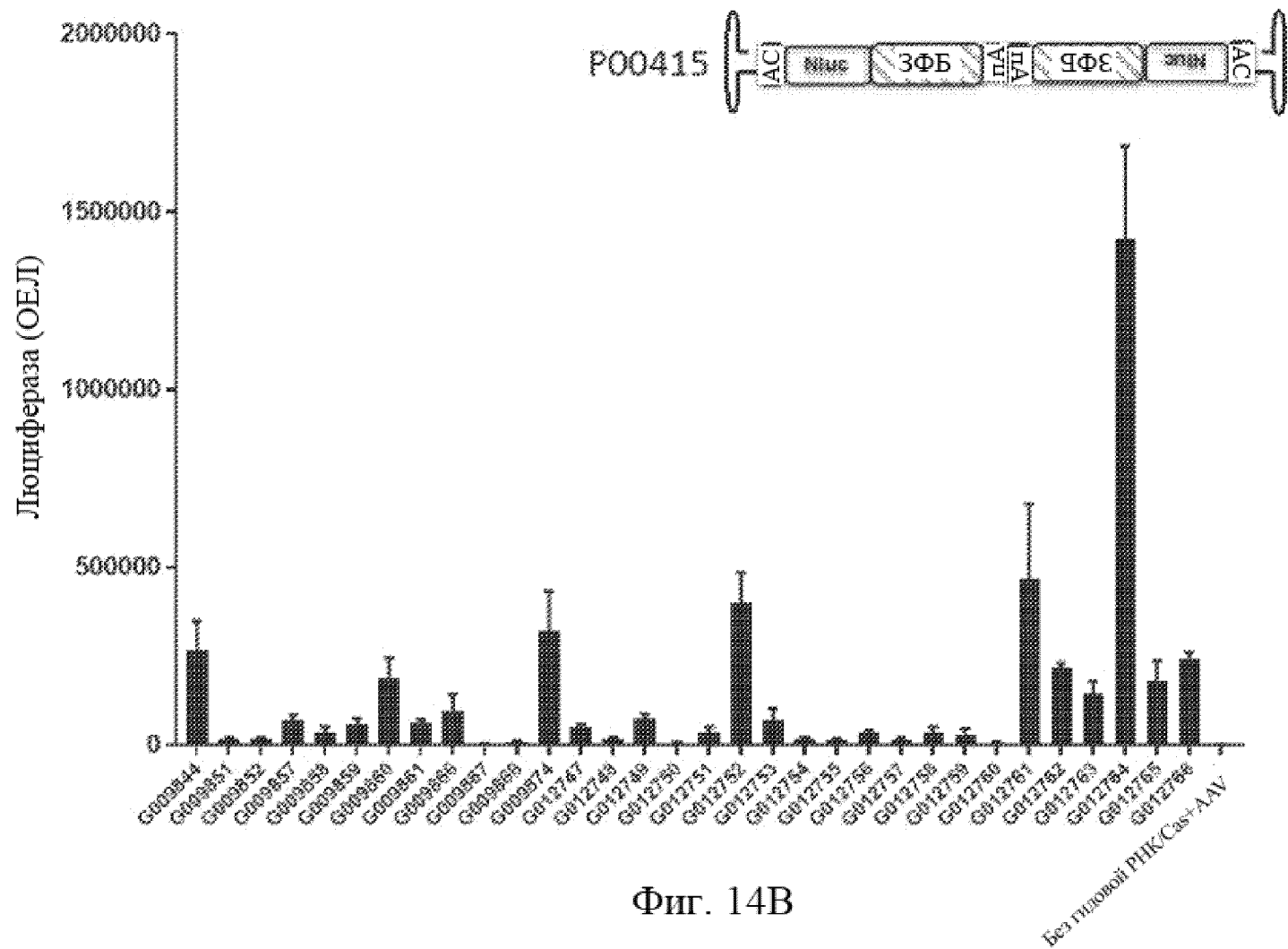
Индели vs ОЕЛ



Фиг. 13С

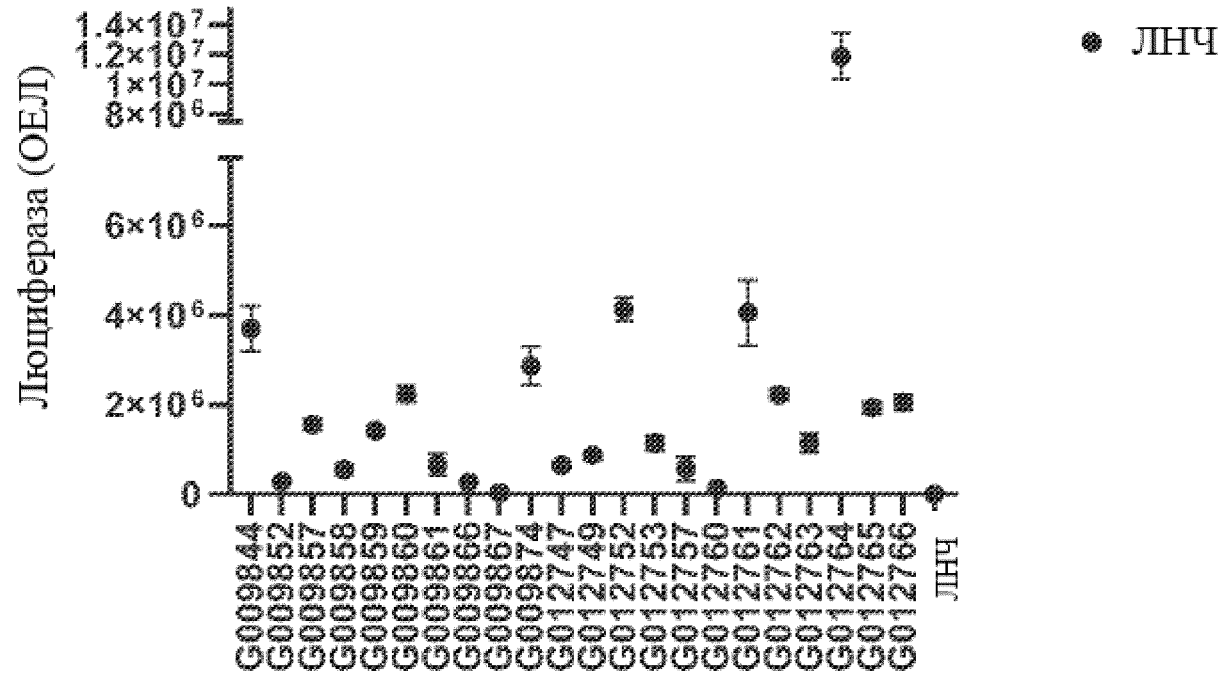


Фиг. 14А

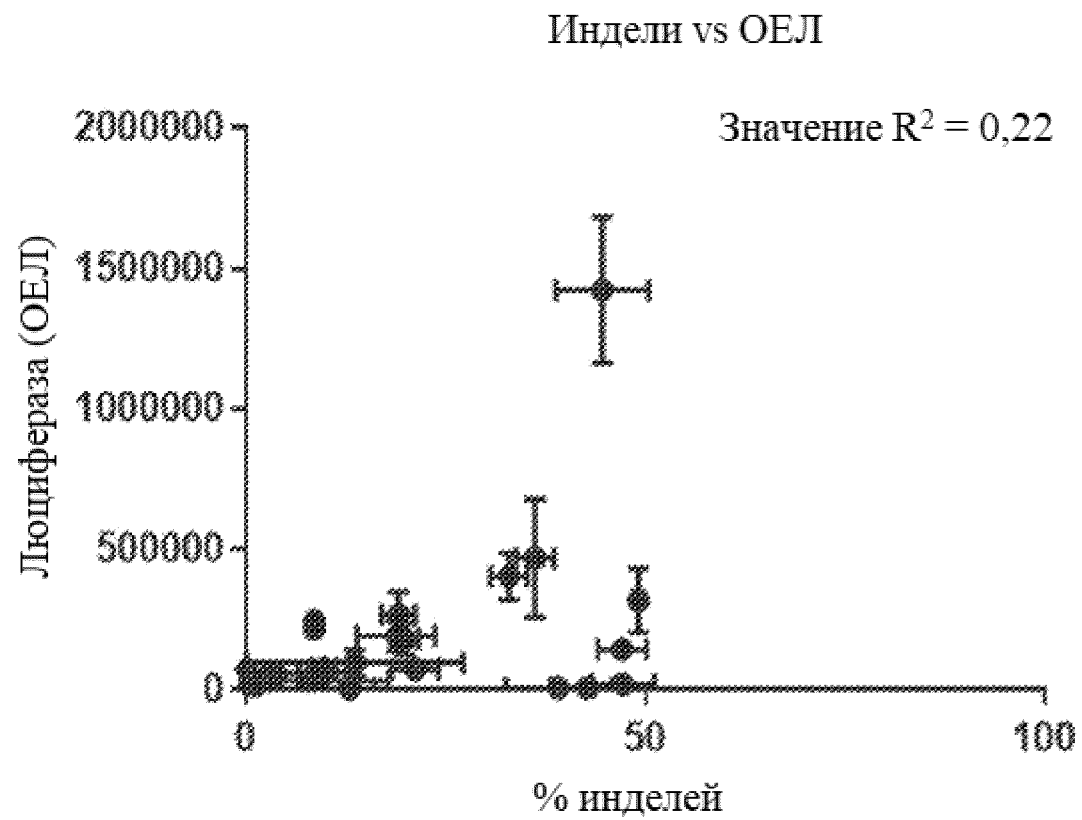


Фиг. 14В

Скрининг гРНК вставки альбумина человека

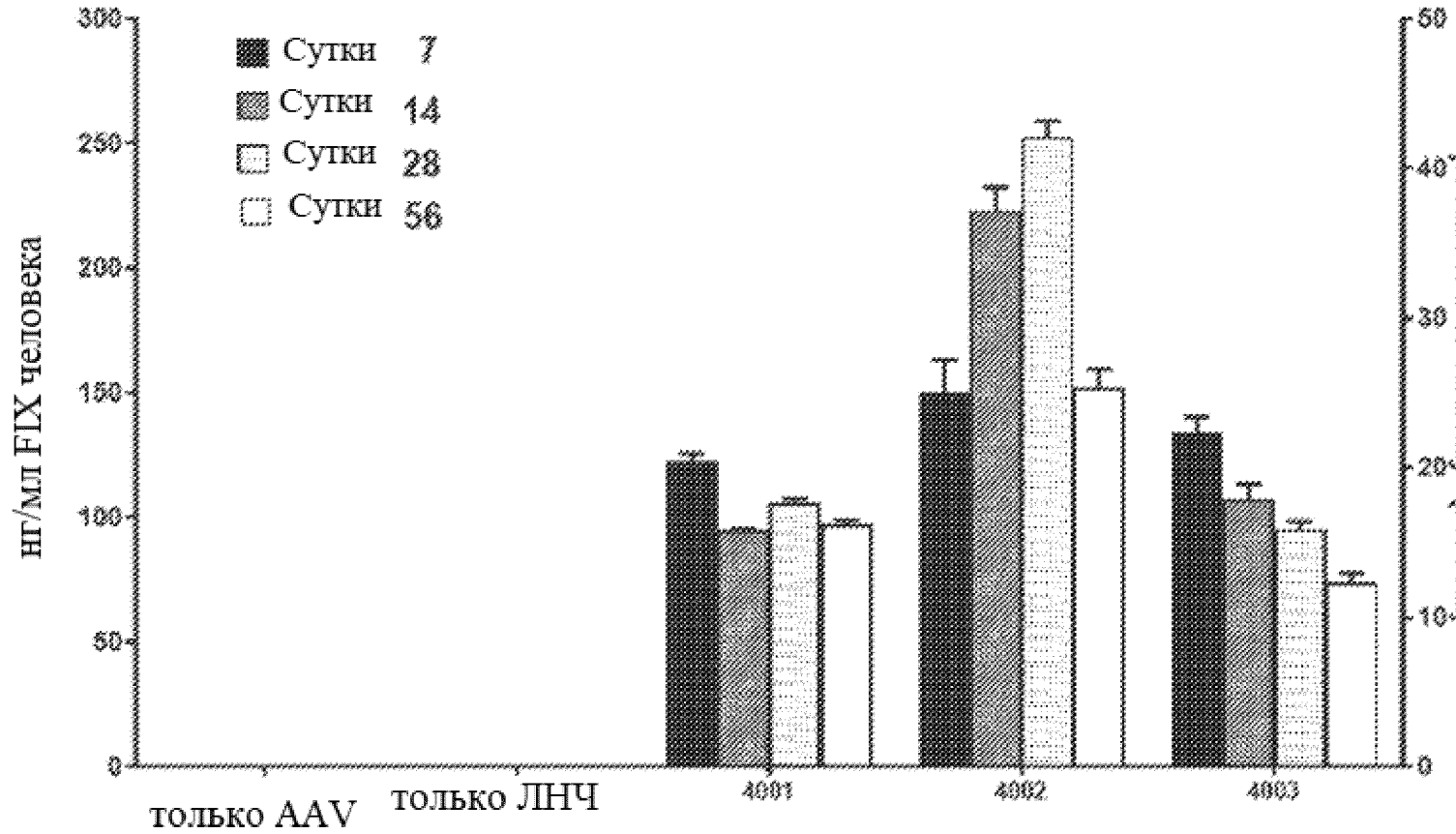


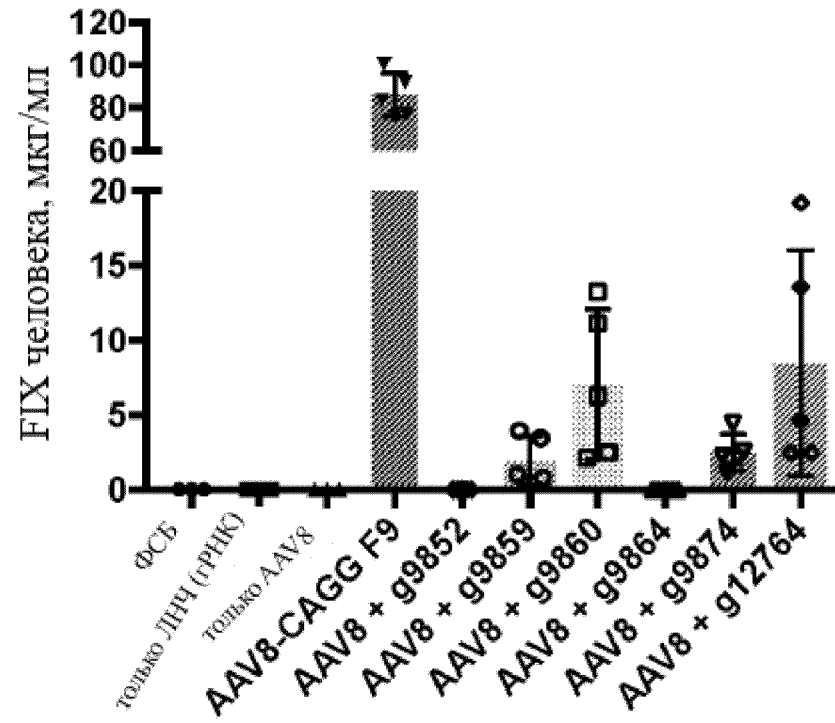
Фиг. 14С



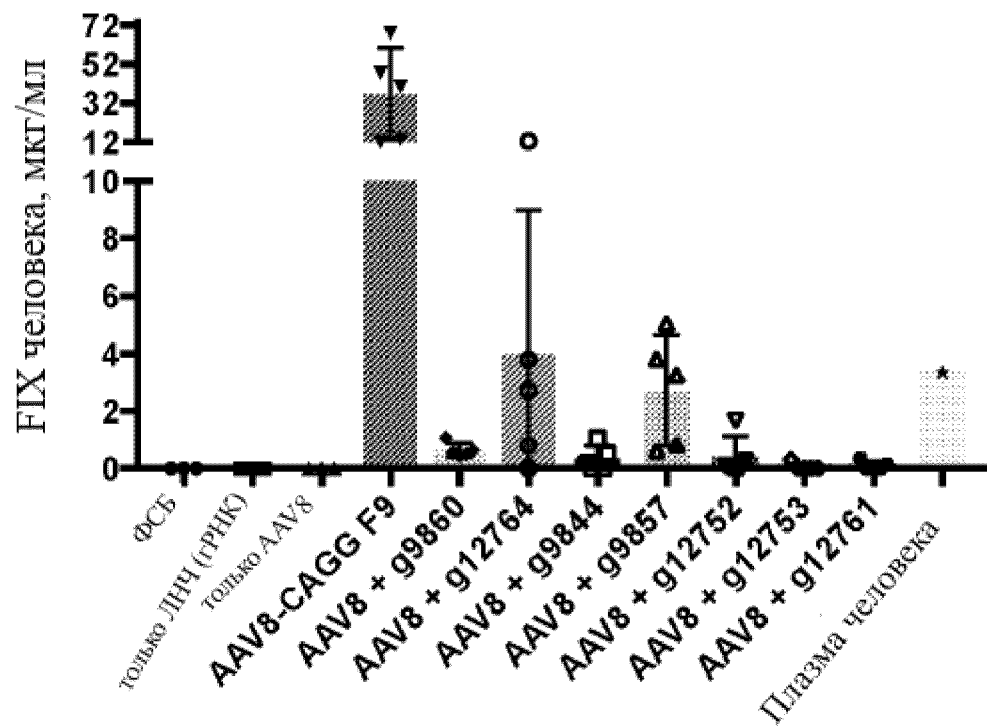
Фиг. 14D

Фиг. 15

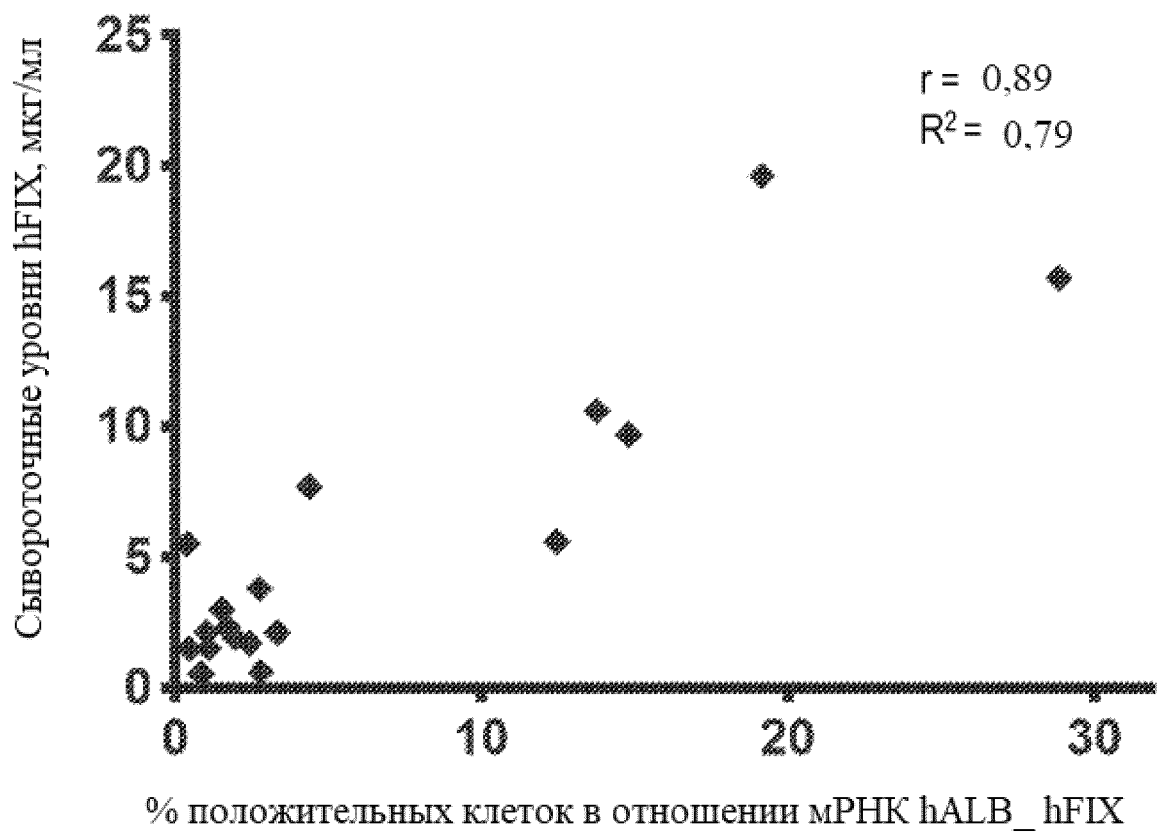




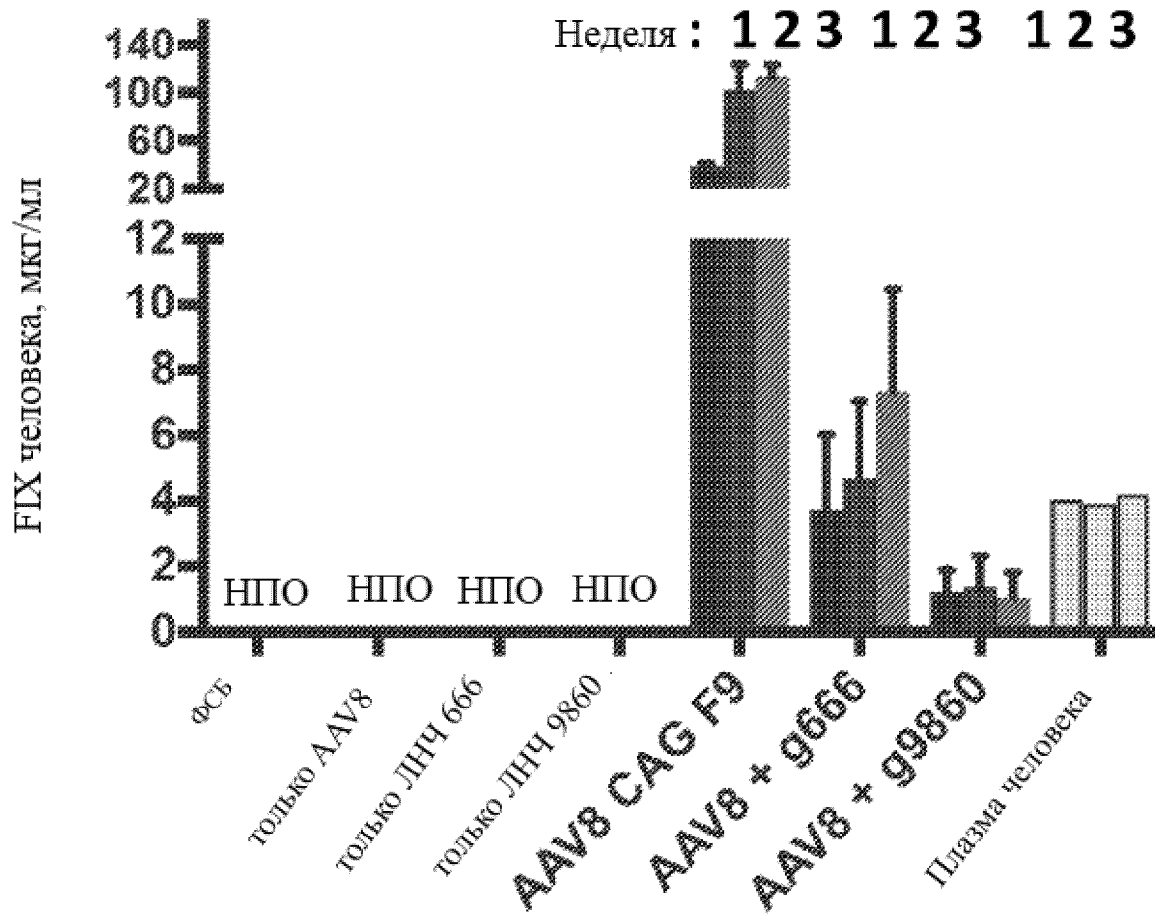
Фиг. 16А



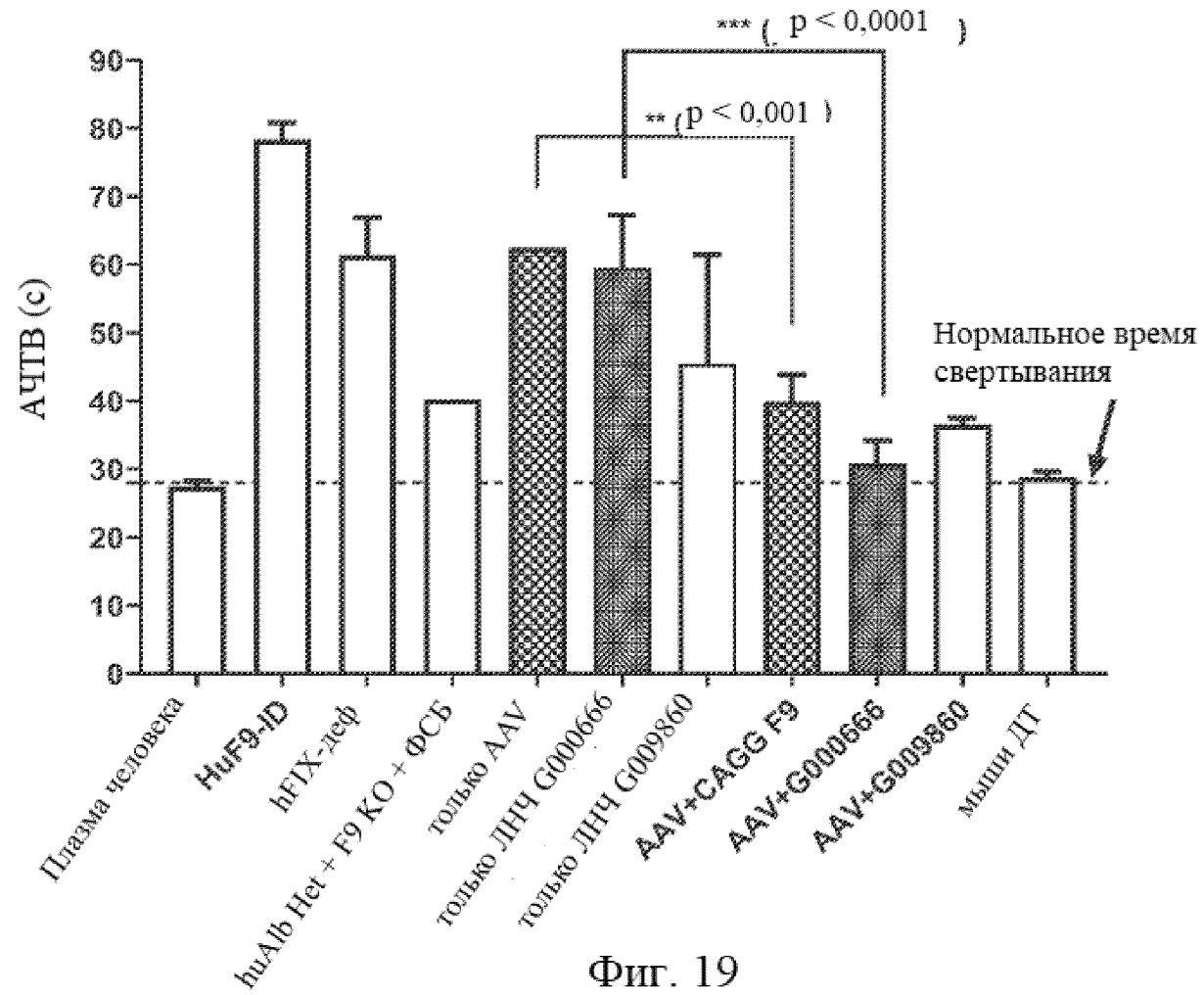
Фиг. 16В



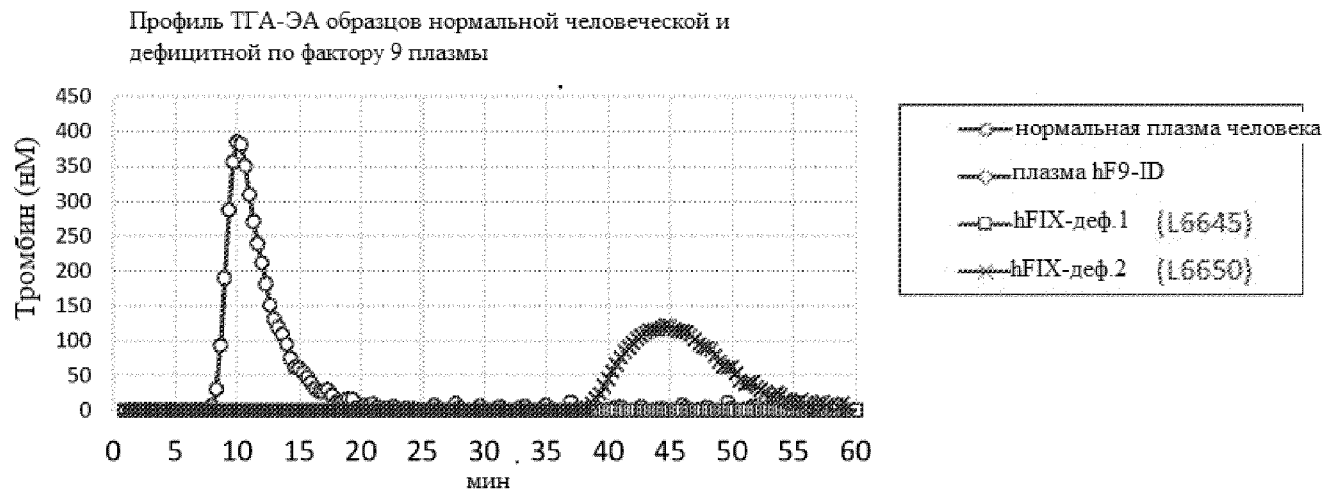
Фиг. 17



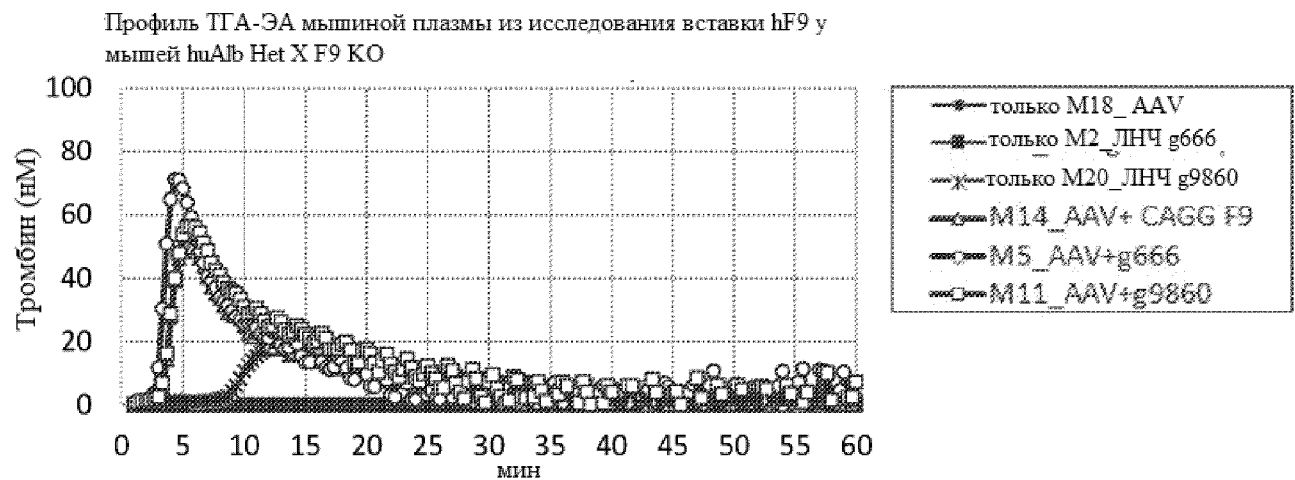
Фиг. 18



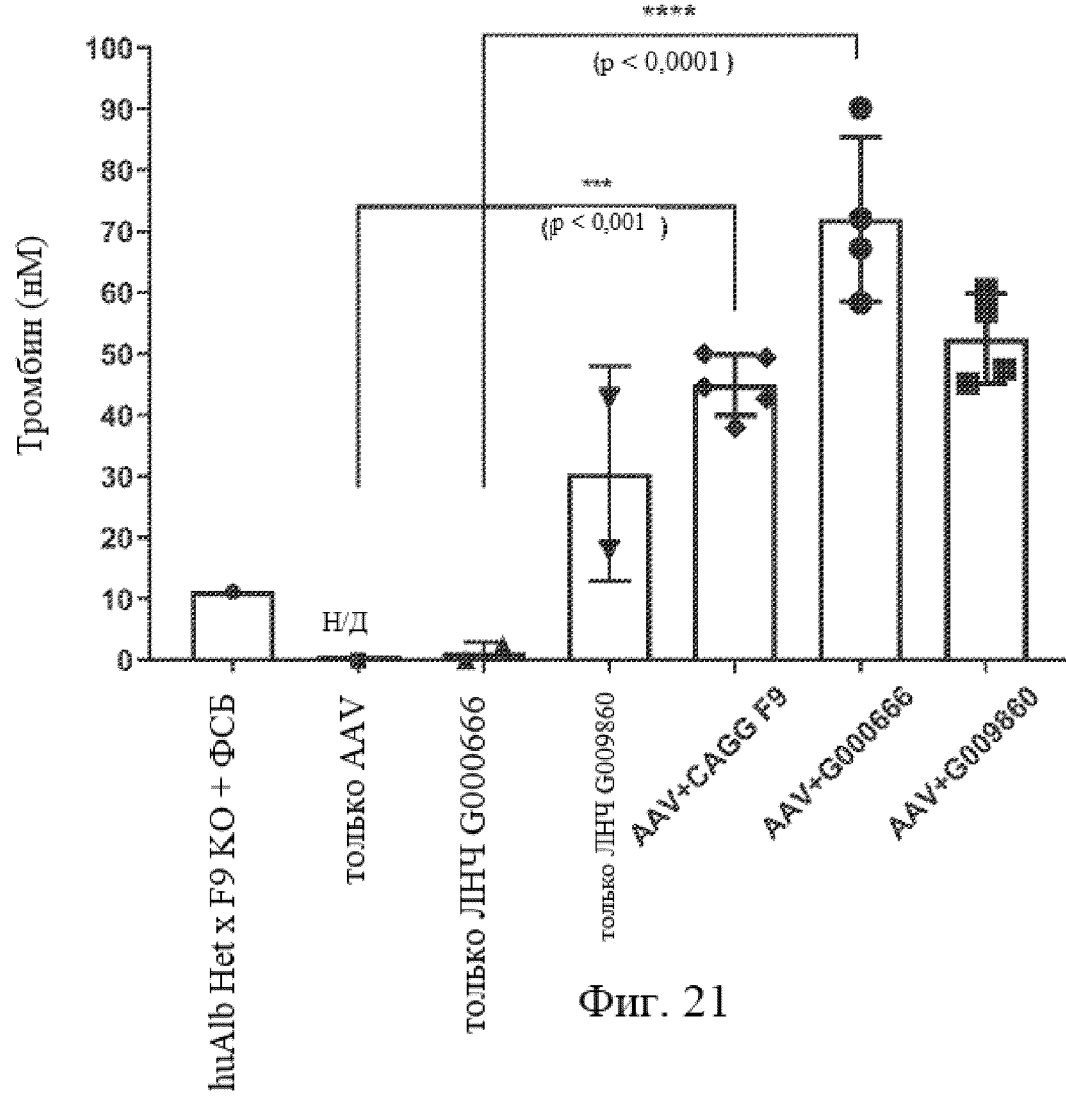
Фиг. 19



Фиг. 20А



Фиг. 20В



Фиг. 21